

دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

رساله دکتری رشته شیلات (ph.D)

موضوع:

بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) در

آبهای خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش PCR-RFLP

استادان راهنما:

دکتر سهراب رضوانی گیل کلایی

دکتر غلامحسین وثوقی

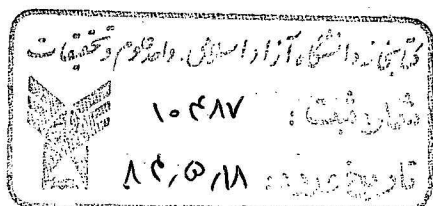
استادان مشاور:

دکتر بهرام کاظمی

دکتر امین کیوان

نگارش:

رضا نهاوندی



سال تحصیلی ۸۴-۱۳۸۳

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	چکیده
۲	مقدمه
۳	تعاریف و اصطلاحات
۶	فصل اول: کلیات
۷	۱-۱- خلیج فارس و دریای عمان از لحاظ اکولوژی و تنوع زیستی
۸	۲-۱- معرفی سرپایان و رده بندی ماهی مرکب
۱۱	۱-۲-۱- ماهیان مرکب شناسایی شده در آبهای خلیج فارس و دریای عمان
۱۱	۲-۲-۱- ریخت شناسی ماهی مرکب
۱۴	۳-۲-۱- خصوصیات زیست شناسی ماهی مرکب
۱۴	۱-۳-۲-۱- حفره عمومی
۱۴	۲-۳-۲-۱- دستگاه تنفس
۱۴	۳-۳-۲-۱- دستگاه گوارش

۱۵ ۱-۲-۳-۴- دستگاه گردش خون
۱۵ ۱-۲-۳-۵- دستگاه دفعی
۱۵ ۱-۲-۳-۶- دستگاه تولید مثلی
۱۶ ۱-۲-۳-۷- زمان تخم‌ریزی در آبهای خلیج فارس و دریای عمان
۱۶ ۱-۲-۳-۸- کیسه مرکب
۱۷ ۱-۲-۳-۹- دستگاه عصبی و اندامهای حسی
۱۷ ۱-۲-۴- ویژگی‌های گونه‌ای ماهی مرکب
۱۸ ۱-۲-۵- پراکنش جغرافیایی ماهی مرکب
۱۹ ۱-۲-۵-۱- پراکنش جغرافیایی ماهیان مرکب اقتصادی جهان
۲۱ ۱-۲-۶- زیستگاه ماهی مرکب
۲۱ ۱-۲-۷- اندازه ماهی مرکب
۲۱ ۱-۳- تکنیک‌های مولکولی و کاربرد آنها جهت بررسی جمعیت و روابط خویشاوندی
۲۲ ۱-۳-۱- DNA میتوکندریایی (mt DNA)
۲۳ ۱-۳-۲- علت انتخاب mt DNA و DNA هسته‌ای جهت مطالعات ژنتیکی
۲۳ ۱-۳-۳- مروری بر تحقیقات مشابه بر روی ژنهای مستقر بر روی mt DNA جانوران مختلف
۲۵ ۱-۳-۳-۱- تکنیک‌های DNA
۲۵ ۱-۳-۴- آنزیم‌های برشی و مزایای استفاده از آن
۲۷ ۱-۳-۵- تکنیک PCR
۲۹ ۱-۳-۵-۱- مراحل PCR
۲۹ ۱-۳-۵-۲- کاربردهای PCR
۳۰ ۱-۳-۵-۳- مشکلات PCR
۳۰ ۱-۳-۵-۴- عوامل مؤثر در موفقیت برنامه PCR
۳۰ ۱-۳-۵-۴-۱- واسرشته شدن دو رشته DNA
۳۱ ۱-۳-۵-۴-۲- چسبیدن آغازگر
۳۱ ۱-۳-۵-۴-۳- توسعه رشته DNA
۳۱ ۱-۳-۵-۴-۴- تعداد چرخه‌ها
۳۲ ۱-۳-۵-۴-۵- Rampin time

۳۲ dNTP غلظت ۶-۴-۵-۳-۱
۳۲ کلرید منی‌زیوم ۷-۴-۵-۳-۱
۳۲ DNA الگو ۸-۴-۵-۳-۱
۳۳ PCR تشدید کننده‌های ۹-۴-۵-۳-۱
۳۳ حذف مهارکننده‌های آنزیم از محیط ۱۰-۴-۵-۳-۱
۳۳ T_m یکسان داشته باشند ۱۱-۴-۵-۳-۱
۳۳ واکنش تکثیر زنجیره DNA با آغازگرهای اختصاصی ۶-۳-۱
۳۳ RFLP _S ۷-۳-۱
۳۳ RFLP تاریخچه ۱-۷-۳-۱
۳۴ RFLP تکنیک ۲-۷-۳-۱
۳۵ RFLP کاربردهای ۳-۷-۳-۱
۳۵ DNA روش الکتروفورز مولکول ۸-۳-۱
۳۵ PCR بر روی ژل آگارز ۱-۸-۳-۱
۳۷ PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید (PAGE) ۲-۸-۳-۱
۳۷ DNA روشهای آشکارسازی باندهای ۳-۸-۳-۱
۳۷ تعیین وزن مولکولی قطعات بدست آمده ۴-۸-۳-۱
۳۸ انواع نشانگرها ۹-۳-۱
۳۸ طبقه‌بندی نشانگرهای ژنتیکی ۱-۹-۳-۱
۳۹ نشانگرهای مرفولوژیک ۱-۱-۹-۳-۱
۳۹ نشانگرهای سیتولوژیک ۲-۱-۹-۳-۱
۳۹ نشانگرهای بیوشیمیایی ۳-۱-۹-۳-۱
۴۰ DNA نشانگرهای ۴-۱-۹-۳-۱

فصل دوم : مواد و روشها

۴۲ مقدمه ۱-۲
۴۲ دستگاههای موردنیاز ۲-۲
۴۳ نمونه برداری ۳-۲
۴۸ مواد و وسایل مورد نیاز نمونه برداری ۱-۳-۲
۴۸ روش و محل‌های نمونه برداری ۲-۳-۲

۴۸	۴-۲- استخراج DNA به روش فنل- کلروفرم
۴۹	۴-۴-۱- مواد مورد نیاز
۵۰	۵-۲- بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده
۵۰	۲-۵-۱- روش الکتروفورز افقی
۵۰	۵-۱-۱- مواد مورد نیاز
۵۱	۲-۵-۱-۲- روش تهیه ژل آگارز ۱/۵ درصد
۵۱	۲-۵-۱-۳- روش کار
۵۲	۲-۶- طراحی آغازگر
۵۲	۲-۷- PCR ژن 18s r RNA
۵۳	۲-۸- مرحله هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم های برشی
۵۴	۲-۹- چگونگی انتخاب آنزیم های برشی
۵۴	۲-۱۰- روش الکتروفورز عمودی (الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید)
۵۴	۲-۱۰-۱- مواد مورد نیاز
۵۵	۲-۱۰-۲- روش تهیه ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد
۵۵	۲-۱۰-۳- روش کار الکتروفورز عمودی
۵۷	فصل سوم
۵۸	۳-۱- نتایج
۷۲	فصل چهارم
۷۳	۴-۱- بحث
۱۰۸	۴-۲- پیشنهادات
۱۰۹	ضمیمه
۱۱۴	فهرست منابع فارسی
۱۱۷	فهرست منابع انگلیسی
۱۲۶	چکیده انگلیسی

این رساله با حمایت مالی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران و همکاری
علمی و اجرایی مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه
علوم پزشکی شهید بهشتی اجرا شد.





چکیده:

این تحقیق به منظور شناسایی جمعیت ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) در ۱۵ ایستگاه نمونه برداری در خلیج فارس و دریای عمان و به روش مولکولی صورت گرفت. نمونه برداری به روش ترال کف از مناطق مختلف خلیج فارس و دریای عمان انجام شد. در نهایت ۴۰-۲۰ نمونه از گونه *S. pharaonis* در هر یک از ایستگاههای مختلف جمع آوری گردید. استخراج *DNA* با استفاده از روش فنل-کلروفرم انجام گرفت. یک جفت آغازگر بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن *18S rRNA* طراحی شد و برای مطالعه تنوع جمعیتی ماهی مرکب از تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از هضم ژن *18S rRNA* که با تکنیک *PCR* تکثیر شده بود استفاده گردید. محصول *PCR* به طول ۵۰۲ جفت باز برای تمامی نمونه‌ها بدست آمده و با استفاده از ۸ آنزیم برشی:

AluI-Taq I-MnII-RsaI-HindIII-DraI-PvuII-HaeIII مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. الگوی باندهای *DNA* در تمام نمونه‌های هضم شده توسط این آنزیمها مشابه بوده و چند شکلی در بین نمونه‌ها مشاهده نگردید. با توجه به نتایج فوق می‌توان نتیجه‌گیری نمود که امکان جداسازی جمعیت‌های مختلف در گونه ماهی مرکب مورد بررسی با استفاده از ژن ریبوزومال *RNA* وجود نداشته است.

مقدمه:

امروزه استفاده از تکنیک‌های پیشرفته ژنتیکی PCR-RFLP در مطالعات زیستی از قبیل اصلاح نژاد آبزیان، تشخیص بیماری‌ها حتی قبل از بروز علائم ظاهری آن، شناخت جمعیت‌ها و نژادهای مختلف، تهیه بانک ژنی، انتقال صفات و ... کاربرد بسیار زیاد پیدا نموده است. اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبزیان و توسعه آبرزی پروری، زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که شناسایی ذخایر ژنتیکی گونه‌های بومی منطقه مورد مطالعه قرار گیرد. اولین گام در این زمینه تشخیص صحیح گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا نژادها می‌باشد که این امر هم از نظر مدیریت شیلاتی و هم برای برنامه حفاظت از گونه‌ها بسیار مهم است. با توجه به اینکه هر یک از ذخایر گونه‌ها از جهت خصوصیات بیولوژیک مانند تولید مثل، درصد بازماندگی، تلفات مهاجرت و تغذیه و ... دارای رفتارهای متفاوت‌اند و بر حسب میزان صید و یا تکثیر، عکس العمل مستقلى از خود نشان می‌دهند. ضروری است قبل از اجرای هر برنامه مدیریتی یا تولیدی، نژادها و جمعیت‌های مربوط را مورد شناسایی قرار داد که امروزه روشهای مولکولی از دقیق‌ترین روشهای پذیرفته شده در این زمینه‌ها می‌باشند. بکارگیری تکنیک PCR و تجزیه و تحلیل RFLP قدرت تشخیص بسیار بالایی داشته و احتمال اشتباه در آن بسیار کم می‌باشد و نیز دقت زیاد و سرعت بالا از دیگر مزایای این تکنیک است که باعث گردیده باب نوینی در علم ژنتیک گشوده شود. (Bonnaud et al., ۱۹۹۷).

در حال حاضر چنین به نظر می‌رسد که سرپایان (Cephalopoda) و در میان آنها ماهی مرکب، یکی از مهمترین منابع زنده آبی را تشکیل می‌دهد که با اعمال مدیریت شیلاتی در آینده نزدیک در جهت بهره برداری بهینه از ذخایر آن بتوان سرمایه‌گذاری و در نتیجه برداشت بیشتری به عمل آورد، ماهی مرکب بیری (Ehrenberg., ۱۸۳۱)

(*Sepia pharaonis*) از رده سرپایان و گونه غالب سرتاسر آبهای جنوب کشور بوده و در سرتاسر محدوده تمام هشت کشور حوضه جنوبی خلیج فارس و دریای عمان وجود دارد و ضرورت یک مطالعه مشترک و همزمان را طلب می‌نماید. ۳ درصد از میزان کل صید استحصالی در دریای عمان را سرپایان بالاخص ماهی مرکب واسکوئید تشکیل می‌دهند. در منطقه آبهای استان هرمزگان ذخایر ماهی مرکب از اهمیت کمتری نسبت به مناطق استانهای همجوار خود برخوردار است.

تا کنون روشهای متعددی برای شناسایی ذخایر آبزیان بکار رفته ولی آنچه که امروزه می‌توان از آن بعنوان یک تکنیک قابل اعتماد یاد کرد، استفاده از روشهای مولکولی جهت تفکیک جمعیت‌ها و یا ذخایر آبزیان بر حسب گونه و یا زیر گونه است. آگاهی از اینکه ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) در دو اکوسیستم خلیج فارس و دریای عمان دارای ساختار ژنتیکی واحد بوده و متعلق به یک جمعیت می‌باشند یا دارای جمعیت‌های متفاوتی هستند، در برنامه ریزی مدیریت شیلاتی برای بهره برداری از ذخایر دریایی و نیز در امر بازسازی ذخایر، حائز اهمیت می‌باشد.

تعاریف و اصطلاحات:

برای فهم بهتر و تجزیه و تحلیل داده‌ها لازم است که از نظر مفهومی اصطلاحات ذخایر، ساختار جمعیت و ... تعریف گردد:

کوشینگ در سال ۱۹۶۸ ذخیره (Stock) را به عنوان گروهی از جانوران در نظر گرفت که دارای یک منطقه تخم‌ریزی مشخص بوده و بالغین آنها هر ساله جهت تخم‌ریزی به آن بازگردند. لارکین در سال ۱۹۷۲ تعریف زیر را از ذخیره ارائه نمود:

گروهی از جانوران که دارای خزانه ژنی مشترک بوده و به اندازه کافی مشخص باشد تا بتوان بر آن مدیریت نمود.

گولاند مفهوم ذخیره واحد (unit stock) را چنین بیان کرد:

زیرگروهی از یک گونه که بتوان آنرا به صورت یک ذخیره محسوب نمود و اختلاف‌های احتمالی درون گروه و تبادل‌های آن با گروههای دیگر را بتوان نادیده گرفت (FAO, ۱۹۸۴).

خزانه ژنی (Gene Pool): منظور کل ژنهای موجود در افراد (گامت‌های) بارور یک جمعیت را خزانه ژنی نامند. در یک جمعیت مندلی افراد موجود در جمعیت بطور یکسان در شکل‌گیری خزانه ژنی نقش دارند (FAO, ۱۹۸۴).

هاپلوتیپ: ترکیب خاصی از قطعات RFLP را گویند (Lewin, ۱۹۹۴).

ساختار جمعیتی یک گونه: مجموعه افراد متعلق به یک جمعیت که از خزانه ژنی واحدی برخوردارند، اطلاق می‌گردد، به استثناء جمعیت‌هایی که به طور آشکار از نظر جغرافیایی از هم جدا هستند و هیچ

ارتباطی باهم ندارند. سایر جمعیت‌ها ممکن است باهم تبادل افراد داشته باشند و این امکان وجود دارد که تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها وجود نداشته باشد. در مواردی، سدهای تولید مثلی پنهانی ممکن است از تبادل اطلاعات ژنتیکی بین جمعیت‌ها جلوگیری نمایند. بعلاوه در طول چرخه زندگی یک گونه ممکن است اعضای یک جمعیت بطور فیزیکی با اعضای جمعیت‌های دیگر مخلوط باشند ولی در زمان تخم‌ریزی در رودخانه کاملاً از یکدیگر جدا شوند (مثل ماهی آزاد اقیانوس آرام).

انواع ساختار جمعیت :

ساختار جمعیت یک گونه می‌تواند یک جمعیت تولید مثلی منفرد، جمعیت‌های متعدد و مجزا، جمعیت‌هایی که گاهی باهم معاوضه گامتی دارند ولی در اصل بوسیله مسافت جغرافیایی از هم جدا هستند، جمعیت‌هایی که در کنار یکدیگر زندگی می‌کند ولی از نظر تولید مثلی مجزا هستند و یا ترکیبی از تمام موارد بالا باشند (Whitmore., ۱۹۹۰).

توسعه آبی‌پروری در هر کشور زمانی با موفقیت همراه بود که ضمن تلاش جهت شناسایی ذخایر ژنتیکی بومی خود، به اصلاح نژاد اقدام و در عرصه افزایش تولید در واحد سطح به شیوه‌ای عمل نمود که حداقل اثرات منفی را به اکوسیستم‌های آبی داشته باشد (پورکاظمی، ۱۳۷۷). یکی از اهداف مدیریت شیلات، بدست آوردن جزئیات راجع به ذخایر آبزیان و فهم این نکته که چگونه این ذخایر با همدیگر و محیط خود اثر متقابل دارند، می‌باشد تا با آگاهی و معلومات کامل از ژنتیک و تمایز هر ذخیره از فشار عملیات صید بر روی ساختار ژنتیکی ذخایر ضعیف خودداری نمایند. به طور ایده‌آل از توصیف ژنتیکی ذخایر ماهیان، اطلاعاتی بدست می‌آید که بازتاب ساختار ژنتیکی ذخایر است بدون اینکه بازتابی از فاکتورها و عوامل محیطی باشد. برای مدیریت بهینه جمعیت ماهیان، اطلاعاتی در مورد ساختار ذخایر لازم است که بتوان تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها را حفظ نمود.

در سالهای گذشته، نادیده گرفتن تنوع ژنتیکی در تصمیمات مدیریت شیلات به دو علت بود:

۱- نبود وسایل و ابزارهای لازم برای مشخص کردن تنوع ژنتیکی.

۲- پافشاری و اصرار بر خصوصیات مرفولوژیک برای ارزیابی تنوع بین جمعیتها، همچنین به منظور حفظ ثبات اختلاف ژنتیکی برنامه‌های مدیریتی، فاقد موضوعات روشن و مشخص بود. جنبه‌های ژنتیکی مدیریت ذخایر ماهیان از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است زیرا پتانسیل یک جمعیت را درحقیقت ژنتیک آن جمعیت تعیین می‌کند با وجود اینکه برای پدیدار شدن پتانسیل ذخایر ماهیان، وجود محیطی مناسب الزامی است، اما باید توجه داشت که پتانسیل بیولوژیک هر جمعیت در حقیقت به آلل‌های موجود در آن جمعیت بستگی دارد.

فصل اول

کلیات



۱-۱- خلیج فارس و دریای عمان از لحاظ اکولوژی و تنوع زیستی

خلیج فارس بین ۳۰ درجه و ۲۴ دقیقه عرض شمالی و ۴۸ درجه و ۵۷ دقیقه طولی شرقی واقع شده است.

خلیج فارس یک دریای نیمه بسته است که بازوی اقیانوس هند بشمار می‌رود.

خلیج فارس پیکره دریایی سواحل جنوبی ایران محسوب می‌گردد که خط گسترده سواحل آن ۱۳۰۰ کیلومتر می‌باشد که از اروندرود (خوزستان) تا تنگه هرمز (هرمزگان) را شامل می‌شود. خلیج فارس، دریای کم عمق و در گروه آبهای گرمسیری، وسعتی در حدود ۲۳۲۸۵۰ کیلومتر مربع دارا می‌باشد و از طریق تنگه هرمز با دریای عمان مرتبط است. عمق خلیج فارس از غرب به شرق افزایش می‌یابد، بطوریکه متوسط عمق ۲۰-۳۰ متر بوده و حداکثر عمق در تنگه هرمز به ۱۰۰ متر می‌رسد (ولی نسب، ۱۳۷۸). یک جریان سطحی از اقیانوس هند با وسعت اندک و در جهت عکس عقربه ساعت در امتداد سواحل شمالی بطور دائم موجب می‌شود تا آبهای خلیج فارس بطور متوسط هر سه تا پنج سال یکبار بطور کامل با آبهای اقیانوس عوض شود (شینی ماندنی، ۱۳۷۳). خلیج فارس با ویژگی‌های خود از قبیل عمق کم، شوری آب و ارتباط محدود با آبهای آزاد جهان، اکوسیستم مخصوصی را تشکیل داده و مجموعه حیاتی را در کف، سطح و داخل سواحل بوجود آورده است (کردوانی، ۱۳۷۴). دریای عمان، پیکره دریای سواحل جنوب شرقی ایران محسوب می‌گردد که خط گسترده سواحل آن از حدود عرض جغرافیایی ۲۷ درجه شمالی در تنگه هرمز (جنوب بندرعباس) شروع و تا حدود عرض ۴۵° ۲۵' شمالی (حدود گواتر) به سمت جنوب گسترده شده و در مجاورت دو استان جنوبی هرمزگان و سیستان و بلوچستان واقع شده است. عرض جغرافیایی پائین باعث نزدیکی دریای عمان به خط استوا و بالطبع تاثیرپذیری از شرایط آن گردیده است.

به این ترتیب دریای عمان، خصوصاً مرزهای شمالی آن در امتداد سواحل ایران و پاکستان، در محدوده اقلیمی شرایط نیمه گرمسیری (subtropical) یا زیر استوایی (subequatorial) قرار دارد. طول نوار ساحلی این دریا ۶۱۰ کیلومتر است که ۳۰۰ کیلومتر آن مربوط به آبهای ساحلی استان سیستان و بلوچستان می‌شود. دریای عمان در حاشیه شمالی خود و از سرتاسر تنگه هرمز تا سواحل پاکستان دارای فلات قاره بسیار کم عرضی است که پهنای متوسط آن به حدود ۲۰ کیلومتر بالغ می‌شود (ولی نسب، ۱۳۷۸). تا کنون ۷۸۰ گونه از ماهیان متعلق به ۱۸۰ خانواده از منطقه خلیج فارس و دریای عمان معرفی شده‌اند که در این بین

فقط ۲٪ از کل گونه‌های موجود از گونه‌های بومی خلیج فارس و دریای عمان به حساب می‌آیند (مخیر، ۱۳۸۱) و (دهقانی پشترودی، ۱۳۷۵).

۱-۲- معرفی سرپایان و رده بندی ماهی مرکب

سرپایان شامل گروهی از نرم تنان بوده که دارای قرینه دو طرفی با یک سر توسعه یافته به همراه تاجی از زوائد متحرک که دهان را محاصره کرده‌اند می‌باشد. این موجودات قادرند سریعاً تغییر رنگ داده و خود را با رنگ محیط مطابقت دهند و در مقایسه با ماهیان، مقدار کمتری تخم در آب رها می‌کنند. از سرپایان، ۱۰۰۰ گونه در جهان شناسایی شده که متعلق به ۴۳ خانواده بوده و از سطح تا عمق ۵۰۰۰ متری زندگی می‌کنند. بر اساس بسیاری از کتب سیستماتیک بی مهرگان از جمله Barnes (۱۹۸۷) شاخه نرم‌تنان به ۷ رده تقسیم می‌شوند (ولی نسب، ۱۳۷۸):

۱- رده تک صدفان (Monoplacophora)

۲- رده شکم پایان (Gastropoda)

۳- رده چند صدفان (Polyplacophora)

۴- رده بی صدفان (Aplacophora)

۵- رده دو کفه‌ایها (Bivalvia)

۶- رده ناوپایان (Scphopora)

۷- رده سرپایان (Cephalopoda)

در تقسیم بندی های قدیمی سرپایان به دو زیر رده دو آبشش ایها و چهار آبشش ایها تقسیم می شدند. از میان زیر رده چهار آبشش ایها، خانواده نوتیلوئیده (Nautilidae) از دوران اول تا به امروز باقی مانده و خانواده های دیگر این زیر رده که در دورانهای مختلف زمین شناسی زیست کرده و منقرض شده اند شامل: Cyrtoceratidae, Orthoceratidae می باشد.

بر اساس رده بندی جدید با استفاده از منابع علمی از جمله رده سرپایان، گروههای اصلی زیر را شامل

می شوند: (Boletzky، ۱۹۹۹)

الف) زیر رده Ammonoidea

ب) زیر رده Coleoidea

۱- راسته Belemnnoidea

۲- راسته Octopoda

A) زیر راسته Cirrata

B) زیر راسته Incirrata

a) خانواده Argonautidae (*Argonauta sp*)

b) خانواده octopodidae: نمونه های این خانواده عبارتند از:

- *Bathypolypus arcticus*

- *Hapalochlaena lunulata*

- *Octopus briareus*

- *Octopus briareus*

- *Octopus dofleini*

- *Octopus macropus*

- *Octopus vulgaris*

- *Octopus rubescens*

- *Octopus salutii*

c) خانواده Tremoctopodidae ← *Tremoctopus violaceus*

۳) راسته Sepiidea

a) خانواده Sepiadariidae ← *Sepioloidea lineolata*

b) خانواده Sepiidae ←

Sepia aculeata

Sepia apama

Sepia arabica

Sepia bertheloti

Sepia elegans

Sepia esculenta

Sepia furcata

Sepia hierredda

Sepia hironda

Sepia latimanus
Sepia nonaehollandiae
Sepia murrayi
Sepia officinalis
Sepia omani
Sepia opipara
Sepia orbignyana
Sepia papuensis
Sepia pharaonis
Sepia prashadi
Sepia robsoni
Sepia savignyi
Sepia smithi

۴- راسته *Sepiolidea*

خانواده *Sepiolidae*

Euprymna scolopes

Heteroteuthis dispar

Rossia paeifica

۵- راسته *Teuthida* (Squid)

(A) زیر راسته *Myopsina*

خانواده *Lologinidae*

Loligo forbesi

Loligo opalescens

Loligo pealei

Loigo vulgaris

Sepioteuthis sepioidea

(B) زیر راسته *Oegopsina*

(a) خانواده *Architeuthis* ← *Architeuthis dux*

(b) خانواده *Taningia* ← *Architeuthida danae*

(c) خانواده *Illex illecebrosus* ← *Octopoteuthis*

(۶) راسته *Vampyromorphida*

- خانواده *Vampyroteuthis infernalis* ← *Vampyroteuthidae*

(ج) زیر رده *Nautilus pomilius* ← *Nautiloidea*

۱-۲-۱- ماهیان مرکب شناسایی شده در آبهای خلیج فارس و دریای عمان

در آبهای جنوب کشور تا کنون ۸ گونه ماهی مرکب از دو جنس *Sepiella*, *Sepia* شناسایی شده که تماماً متعلق به خانواده *Sepiidae* می باشند. از جنس *Sepia* هفت گونه و از جنس *Sepiella* فقط یک گونه تا کنون گزارش شده است (ولی نسب، ۱۳۷۸؛ FAO, ۱۹۸۴).

۱-۲-۲- ریخت شناسی ماهی مرکب ببری

ماهی مرکب شامل گروهی از سرپایان بوده که دارای قرینه دو طرفی با یک سر توسعه یافته شامل تاجی از زوائد متحرک که دهان را محاصره نموده اند، می باشد. ماهی مرکب دارای یک جفت چشم درشت بوده که در طرفین سر و دور از هم قرار گرفته اند و توسط رشته های عصبی بینایی به مغز متصل می گردند. چشم در ماهی مرکب بسیار پیشرفته و تکامل یافته است. چشمها تقریباً کروی شکل و بطور معمول هر دو چشم از نظر اندازه و شکل شبیه همه هستند. سر ماهیان مرکب بخوبی توسط یک گردن از بدن متمایز شده است. جبه در قسمت پشتی با سر کاملاً یکی شده و توسط یک نوار پوستی در گردن که باریک و یا در برخی موارد عریض است به آن متصل می شود.

انتهای جبه توسط غضروف گردنی در ناحیه پس سری بهم متصل می شوند. سر ماهی مرکب ببری تا حدی بزرگتر از عرض جبه در لبه قدامی است و تحت شرایط خاصی سر می تواند به داخل جبه فرو رود. جبه یک پوشش مخروطی شکل است که اندامهای داخلی را احاطه می کند. این عضو به نامهای روپوش و مانتل

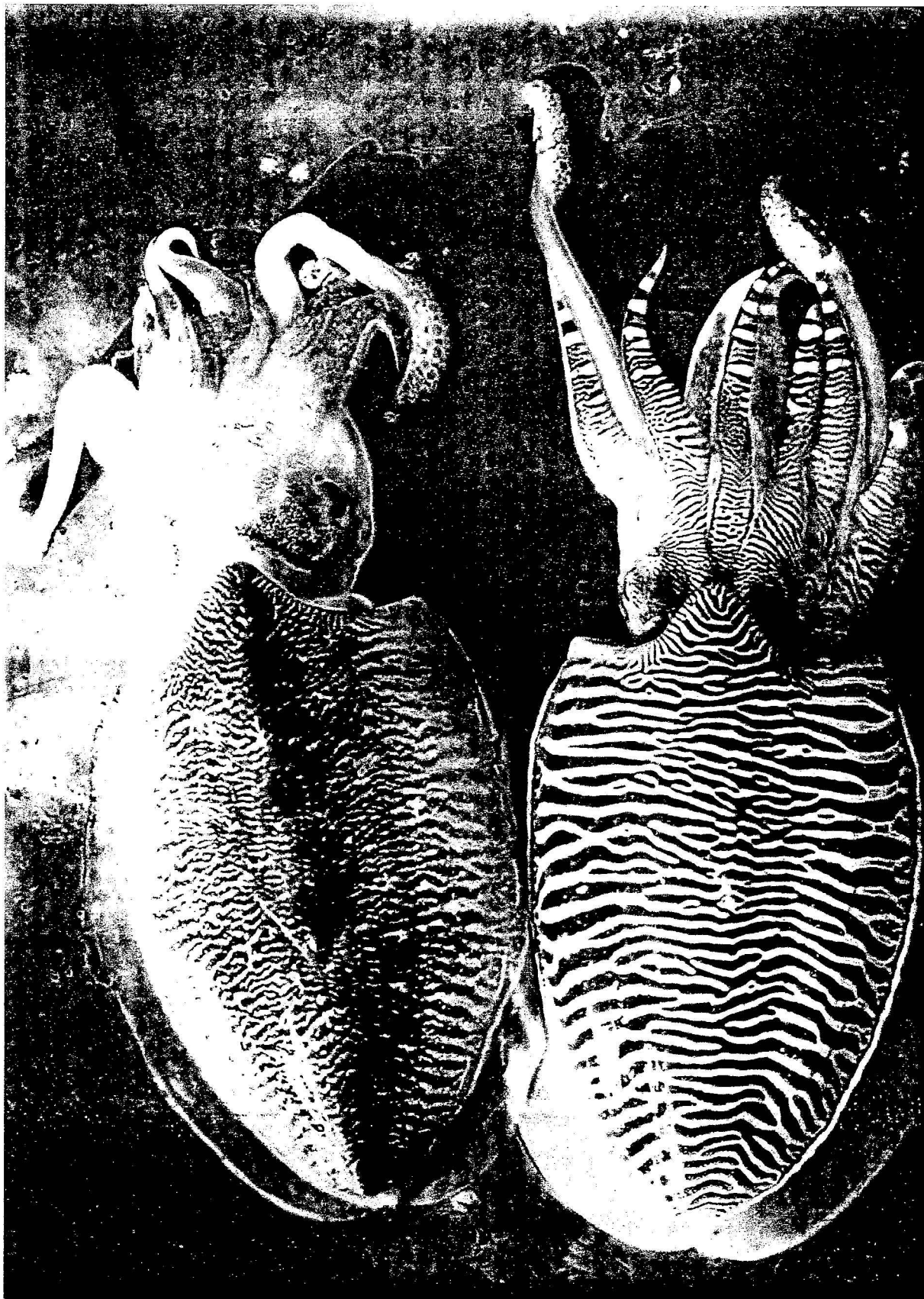
نیز نامیده می‌شود. جبه همانند بازوها، عضلانی بوده و دارای ماهیچه‌های حلقوی و طولی می‌باشد. در نتیجه انقباض و انبساط متناوب آنها، آب در حفره جبه، داخل و خارج می‌شود و در این هنگام عمل تنفس نیز صورت می‌گیرد.

شکل جبه نیز یکی از علائم مشخصه ریخت شناسی ماهیان مرکب بوده که در این گونه، جبه بیضی شکل و پهن می‌باشد. یکی دیگر از کاربردهای جبه کمک در حرکت ماهی مرکب می‌باشد بطوریکه با وارد شدن آب از طریق دهان به داخل حفره جبه و سپس انجام انقباض آب از طریق قیف خارج شده و در این حالت آبروی با یک حرکت سریع و رو به عقب شنا می‌کند.

دهان در آنها کوچک و در داخل آن زبان عضلانی که از صفحات شاخی (Radula) پوشیده شده قرار دارد. بر روی غلاف زبان، دندانهای ریزی وجود دارد که بوسیله آنها غذا را سائیده و نرم می‌کنند. دهان دارای یک جفت آرواره منقار مانند کیتینی و قوی می‌باشد که بوسیله آنها طعمه را قطعه قطعه می‌کنند. ماهی مرکب همچون اسکوئید در ناحیه سر دارای ۸ بازو و ۲ تانتاکول است. بازوها و تانتاکولها جهت شنا، خزیدن و چسبیدن بر روی تخته سنگها و نیز کمک به عملیات جفتگیری بکار برده می‌شوند. هر بازو مجهز به یک دو یا چهار ردیف (و یا ندرتاً بیشتر) بادکش می‌باشد. طول هر جفت از بازوها با سایر بازوها متفاوت است که یکی از مشخصات با ارزش تاکسونومیک می‌باشد. بازوهای سمت راست و چپ که در مقابل هم قرار می‌گیرند معمولاً طول برابر دارند، بجز بازوی هکتوکوتیل که در فصل تولید مثل، بلندتر یا کوتاهتر از بازوی مقابل خود است. هر تانتاکول دارای یک پایه قابل ارتجاع بوده که به راحتی جانور قادر است آنها را جمع و در داخل یک جیب (Pocket) فرو برد. قسمت انتهایی تانتاکول اصطلاحاً گرز (Club) نامیده شده که طول گرز تانتاکول و طول تانتاکول یکی از علائم مشخصه ظاهری جهت شناسایی گونه‌ای استفاده می‌گردد.

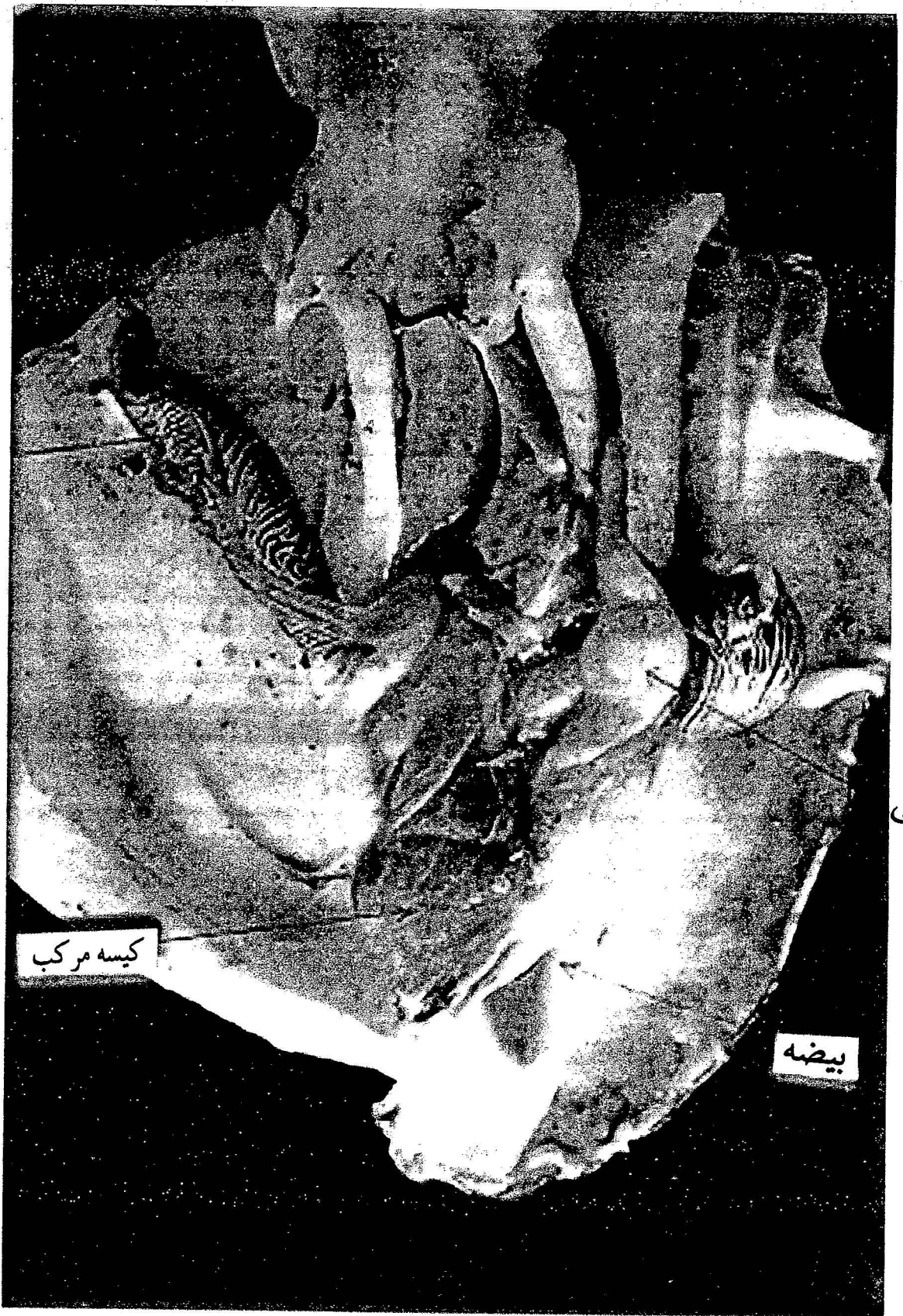
باله‌ها (Fins) در طرفین جبه قرار داشته که مانند باله شنای ماهیان عمل می‌کنند و در واقع اعضاء پیش برنده جانور در شنای آرام هستند و درحین شنای سریع باعث فشردگی بدن می‌شوند. شکل باله، یکی دیگر از خصوصیات تاکسونومیک و وجه مشخصه ماهی مرکب ببری است بطوریکه این گونه دارای باله از نوع حاشیه دار بوده که در حقیقت بصورت یک نوار باریک حاشیه‌ای است که تمام اطراف جنبه را احاطه می‌نماید. لازم به ذکر است که چنین باله‌هایی، وجه مشخصه ماهیان مرکب حقیقی از خانواده Sepiidae

بوده و نشانگر آن است که در حرکت بطرف جلو، آبرزی دارای حرکت آرام و آهسته است و البته در صورت نیاز می‌توانند در شنا سریع نیز مورد استفاده قرار گیرند (ولی نسب، ۱۳۷۸).



جنس نر و ماده ماهی مرکب ببری (S. Pharaonis)

آبشش



یسه منی

شکل اندامهای داخلی جنس *S. Pharaonis* (سوسک مصری)



۱-۲-۳-خصوصیات زیست شناسی ماهی مرکب

۱-۳-۲-۱-حفره عمومی

ماهی مرکب دارای حفره عمومی نسبتاً بزرگی است. درون حفره عمومی بدن از مایعی بنام مایع سلومیک پر شده است که محلولی از آمونیوم و آمونیاک می‌باشد. حفره عمومی در این جانور به حفرات سلومی در کرمهای حلقوی شبیه است که توسط یک تیغه بطور ناقص به دو بخش تقسیم می‌گردد که یکی از آنها بنام حفره دور قلبی (Pericardial) و دیگری بنام حفره دورغشایی (perivisceral) نامیده می‌شود. حفره دور قلبی وسیع شده و شامل قلب، قلب آبششی و غدد پریکاردیال است. بخش حفره احشای نیز بزرگ بوده و در برگیرنده غدد جنسی و معده می‌باشد.

۱-۳-۲-۲-دستگاه تنفس

ماهی مرکب دارای یک جفت آبشش بوده که در دو طرف توده احشایی قرار داشته و جهت تنفس بکار می‌رود و یک اندام اصلی در رده بندی و سیستماتیک سرپایان محسوب می‌گردد. در وسط آبششها یک محور اصلی وجود دارد و فیلامنت‌هایی در طرفین آن بطور متناوب قرار گرفته‌اند. تعداد این فیلامنت‌ها در گونه (*S. pharaonis*) بطور متوسط ۳۵ تا ۵۵ عدد می‌باشد که با عبور رگهای خونی از روی فیلامنت‌های آبششها، تبادل گازها و تنفس صورت می‌گیرد. آبششها از یک طرف به دیواره داخلی جبهه توسط غشاء نازکی مرتبط می‌شود و از طرف مقابل آزاد می‌باشد. جریان آب و ورود آن به داخل جبهه نه تنها جهت حرکت مورد استفاده قرار می‌گیرد بلکه آب اکسیژن دار مورد نیاز آبششها را نیز فراهم می‌کند.

۱-۳-۳-۲-دستگاه گوارش

این دستگاه شامل دهان (مرکب از منقار، سوهانک، آرواره و زبان)، مری، غدد بزاقی، معده، هپاتوپانکراس و روده بوده که در انتها به مخرج ختم می‌شود. البته کیسه مرکب نیز از نظر آناتومیکی به دستگاه گوارش متصل است ولی این عضو در فعالیت گوارش هیچ نقشی ندارد. دهان در وسط بازوها قرار داشته و در حفره دهانی، دو جفت غده بزاقی وجود دارند که مواد و آنزیمهای گوارشی را ترشح می‌کنند. مری بصورت لوله‌ای ساده و استوانه‌ای کشیده شده است. بر طبق نتایج حاصله از بررسیهای انجام شده (ولی نسب، ۱۳۷۲؛ نوری نژاد، ۱۳۷۲ و ۱۳۷۴) ماهی مرکب، شکارچی و گوشتخوار بوده و غذای اصلی

آنها، خرچنگ و میگو بوده و همچنین از ماهیان کوچک و صدف نیز تغذیه می نماید. مشاهده قطعات بدنی از جمله بازوهای ماهی مرکب در محتویات معده، نشانگر وجود رفتار تغذیه همجنس خواری است.

۱-۲-۳-۴- دستگاه گردش خون

سیستم گردش خون ماهی مرکب شامل قلب، قلب‌های آبششی و رگهای خونی است. جریان خون، بسته بوده (تجلی پور، ۱۳۶۴) و این جریان در بدن توسط قلب و دو حفره ضرباندار بنام قلب آبششی صورت می‌گیرد. در قسمت عقب بدن جای گرفته و از یک بطن و دو دهلیز تشکیل شده است. از بطن، سه آئورت خارج می‌شود که یکی از آنها به سمت عقب و دو آئورت دیگر به سمت جلو رفته‌اند. خون سیاهرنگی بوسیله بزرگ سیاهرگ و دو سیاهرگ آبششی به سمت آبششها جریان پیدا می‌کند و قبل از آنکه به آبششها برسد، به دو عضو کوچک ضرباندار بنام قلبهای آبششی وارد شده که حرکات آنها سبب جریان خون می‌گردد. رنگ خون ماهی مرکب تقریباً بی رنگ تا نسبتاً آبی رنگ می‌باشد که این به دلیل رنگدانه خونی هموسیانین است. در پلاسمای خون، علاوه بر هموسیانین، سلولهای خونی شامل لکوسیتها و آمیوسیتها وجود دارد.

۱-۲-۳-۵- دستگاه دفعی

دفع مواد جامد که از طریق مخرج صورت می‌گیرد و دفع مایعات زائد بدن توسط اعضاء دفعی صورت گرفته که تقریباً با اعضای سیستم گردش خون و سیستم تنفسی در ارتباط هستند. سیستم دفعی، شامل کیسه‌های کلیوی که بیشتر برای ذخیره ادرار هستند، غده پریکاردیال که یک اندام دفعی اضافی است، مجرای کلیوی قلبی (renopericardial) ضمام بزرگ سیاهرگ کلیوی که یک کلیه حقیقی بوده و اندام اصلی دفع را تشکیل می‌دهند و بالاخره ضمام دستگاه گوارشی یا ضمام پانکراس که در تنظیم اسمزی نقش داشته و منجر به تشکیل اوره می‌گردد می‌باشد (ولی نسب، ۱۳۷۸).

۱-۲-۳-۶- دستگاه تولید مثلی

دو جنس نر و ماده در ماهی مرکب از یکدیگر جدا هستند و تا حد زیادی می‌توان از خطوط رنگی موجود بر روی جبهه، جنسیت را تشخیص داد بطوریکه ماهی مرکب ببری نر، دارای خطوط پرنرنگ، درشت‌تر و کاملاً واضحی است. دستگاه تولید مثلی جنس ماده شامل یک تخمدان شبیه خوشه انگور، یک عدد مجرای تخم‌بر، غدد تخمدانی و غدد نیدامنتال دو تکه‌ای و تخم مرغی شکل (Nidamental) که در ماهیان بالغ دیده شده و وسط ناحیه شکمی حفره جبهه را اشغال می‌کنند، می‌باشد.

تخمهای ماهی مرکب به شکل خوشه‌های انگور به رنگ زرد بوده و میزان هم‌آوری آنها بطور میانگین برابر با ۷۰۰-۵۰۰ تخم می‌باشد (ولی نسب، ۱۳۷۲). ماهیان مرکب فاقد مراحل لاروی بوده و پس از تخمه‌گذاری، افراد جوان کم و بیش شبیه بالغین خود هستند.

دستگاه تولید مثل نر شامل یک بیضه، مجرای منی (Seminal vesicle) غده ضمیمه، کیسه اسپرماتوفوریک یا اندام نیدهام (Needham's organ) و آلت تناسلی می‌باشد و در نیمه چپ بدن قرار گرفته است.

۱-۲-۳-۷-زمان تخم‌ریزی در آبهای خلیج فارس و دریای عمان

دو فصل تخم‌ریزی مجزا ماهی مرکب در آبهای منطقه سیستان و بلوچستان بشرح ذیل است:

الف) تخم‌ریزی بهاره: از اوایل اسفند ماه تا اواسط اردیبهشت

ب) تخم‌ریزی پاییزه، از اواسط شهریور لغایت اواخر آبان ماه بوده که در حقیقت زمان تخم‌ریزی اصلی را شامل می‌شود (ولی نسب، ۱۳۷۲).

در آبهای منطقه بوشهر، مهمترین فصل تخم‌ریزی، که مصادف با فصل صید ماهیان مرکب است از اواسط بهمن تا اواسط اردیبهشت می‌باشد (نوری نژاد و نیامبندی، ۱۳۷۲).

۱-۲-۳-۸-کیسه مرکب

از نظر آناتومیکی به دستگاه گوارش متصل بوده و یکی از مهمترین مشخصات آن محسوب می‌گردد که در ناحیه پشتی روده قرار دارد مایع آن از طریق منخرج به خارج راه پیدا می‌کند اما هیچ نقشی در فعالیتهای گوارشی ندارد. این کیسه بوسیله دیواره‌ای به دو بخش تقسیم شده که نیمه فوقانی آن در اثر ذخیره مخزن

سفت شده و مرکب در آن نگهداری می‌شود که به هنگام خطر و یا گول زدن طعمه یا سردرگم کردن دشمن در حین حمله در محیط آزاد می‌گردد.

رنگ مایع مرکب، آبی ارغوانی مایل به سیاه بوده و فوق العاده غلیظ است و یکی از بادوام‌ترین رنگهاست.

۱-۲-۳-۹- دستگاه عصبی و اندامهای حسی

ماهی مرکب نسبت به سایر نرم تنان، سیستم عصبی پیشرفته تری دارند. مغز در آنها در یک کپسول غضروفی در بالا و پائین مری قرار داشته و از چهار بخش اصلی تشکیل شده‌اند. اندامهای حسی شامل: چشم، یک جفت اندام تعادلی استاتوسیت‌ها که از آنها برای تعیین سن ماهی مرکب استفاده می‌شود، گیرنده‌های شیمیایی و مکانیکی، بادکشاها، فتورسپتورهای خارج چشمی، زوائد بویایی و... می‌باشد.

۱-۲-۴- ویژگیهای گونه‌ای ماهی مرکب

جبه (Mantel) پهن و کشیده، باله‌ها وسیع و هم اندازه طول جبه، گرزتانتاکولی نسبتاً طویل، غشاء محافظت کننده که در قاعده بهم نمی‌رسند. رنگ بدن معمولاً قهوه‌ای، قرمز و ارغوانی مخطط بوده که به راحتی خود را با رنگ محیط تطبیق می‌دهند. صدف داخلی، آهکی و جبه کاملاً روی آن را می‌پوشاند. بر روی سطح جبه، قسمت پشتی سر و بازوها، نوارهای رنگی ببری شکل (بخصوص در جنس نر) مشخص بوده که علامت بسیار مشخصی برای تفکیک افراد نر و ماده می‌باشد (FAO, ۱۹۸۴).

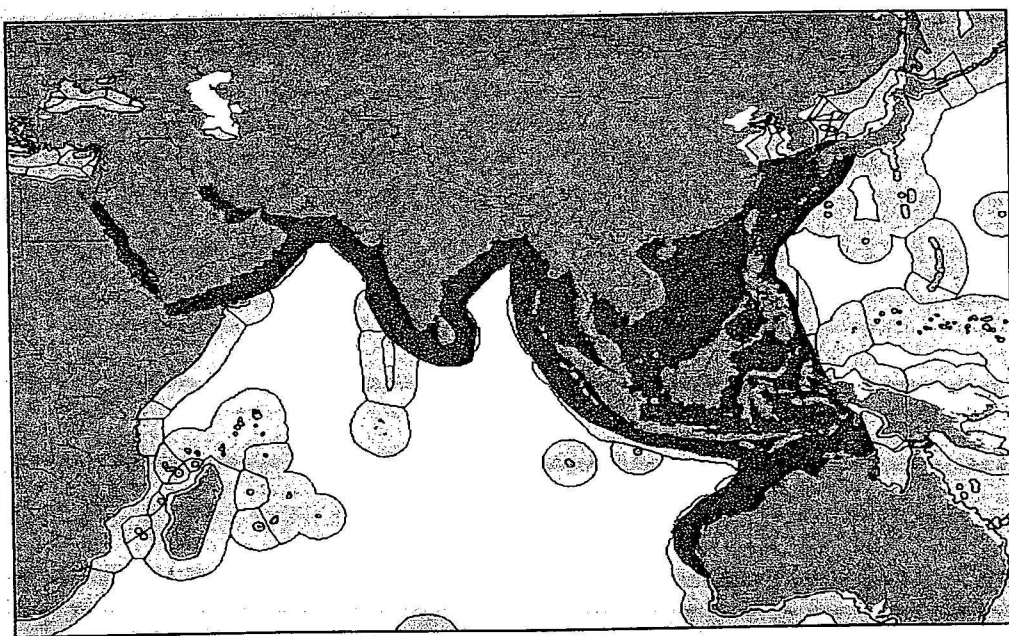
هشت ردیف بادکش بطور عرضی گسترش یافته که ۵ یا ۶ بادکش میانی (سومین و چهارمین ردیف) کاملاً بزرگتر هستند. بازوی چهارم سمت چپ، بازوی هکتوکوتیل یا عضو باروری نام دارد که برای انتقال بسته‌های اسپرماتوفور به داخل بدن جنس ماده استفاده می‌شود.

۱-۲-۵- پراکنش جغرافیایی ماهی مرکب

این گونه ماهی مرکب، گونه غالب موجود در آبهای خلیج فارس و دریای عمان بوده و در سرتاسر آبهای جنوب کشور از استان سیستان و بلوچستان در شرق تا استان خوزستان در غرب پراکندگی دارد. دیگر مناطق پراکنش آن در جهان عبارتند از:

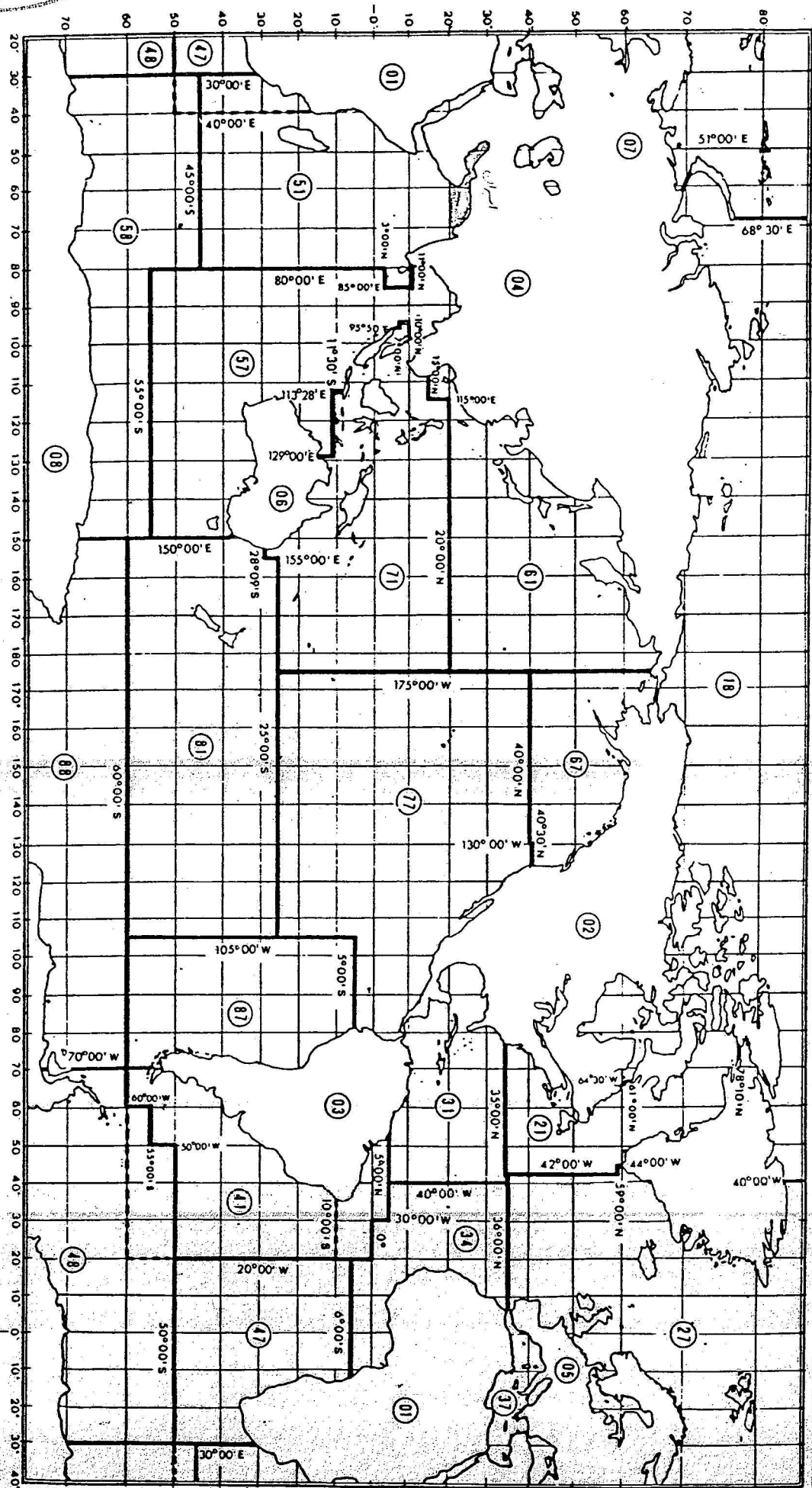
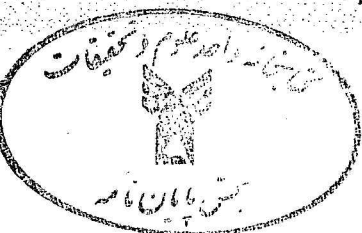
منطقه هند - آرام، دریای سرخ، دریای عرب تا دریای چین جنوبی، دریای چین شرقی، شمال و شمال غربی استرالیا، کشورهای بحرین - کویت - عمان - قطر - عربستان سعودی - امارات متحده عربی - یمن - ایران - عراق - بنگلادش - برونئی - جیبوتی - تیمور شرقی - مصر - هنگ کنگ - هند - اندونزی - اسرائیل - ژاپن - اردن - کره جنوبی - مالزی - مالدیو - میانمار - پاکستان - فیلیپین - سنگاپور - سومالی - سریلانکا - سودان - تایوان - تایلند - ویتنام. در شکل زیر نقشه پراکنش جغرافیایی ماهی مرکب بیری (*S. pharaonis*) نشان داده شده است (برگرفته از سایت اینترنتی (<http://www.Cephbase.utmb.edu/>)).

Distribution Range of *Sepia (Sepia) pharaonis*



۱-۲-۵-۱- پراکنش جغرافیایی ماهیان مرکب اقتصادی جهان

آبهای جهان از دیدگاه صید و صیادی به چندین منطقه صیادی مهم تقسیم می‌شوند که آبهای خلیج فارس و دریای عمان جزء منطقه ۵۱ صیادی محسوب می‌گردند. مهمترین مناطق پراکنش ماهیان مرکب شامل مناطق صیادی ۵۱، ۵۷، ۶۱ و ۶۷ بوده در حالی که گونه‌های مهم اقتصادی آنها در مناطق صیادی ۱۸، ۲۱، ۴۱، ۸۷ وجود ندارند. (در شکل صفحه بعد تقسیم بندی مناطق صیادی مهم جهان با توجه به پراکنش جهانی ماهیان مرکب را نشان می‌دهد).



تقسیم‌بندی مناطق صیادی مهم جهان جهت بهره‌برداری در مشخص نمودن پراکنش ماهیان مرکب.

۱-۲-۶-زیستگاه ماهی مرکب

گونه‌ای نریتیک و عمق زی بوده، به طوری که از ساحل تا عمق ۱۱۰ متری زندگی می‌نماید. حتی بر اساس تجربیات نگارنده به هنگام حضور بر روی شناور تحقیقاتی فردوس یک و سایر شناورهای ترالر صنعتی جهت نمونه برداری از اعماق بالاتر از ۱۱۰ متر نیز صید می‌شود. اما اغلب در اعماق کم تا عمق ۴۰ متری یافت می‌شود، بخصوص در فصل تخم‌ریزی که به طرف ساحل مهاجرت کرده و در آبهای کم عمق تجمع می‌یابد.

۱-۲-۷-اندازه ماهی مرکب

طبق اطلاعات منتشر شده از سوی FAO (۱۹۸۴) حداکثر طول جبهه ۴۸ سانتیمتر برای نرها و ۳۶ سانتیمتر برای ماده‌ها در آبهای جمهوری یمن گزارش شده است ولی معمولاً در اکثر مناطق، نرها حداکثر به ۳۸ سانتیمتر و وزن ۴۵۰۰ گرم و ماده‌ها به طول ۲۳ سانتیمتر و وزن ۲۷۰۰ گرم می‌رسند. اندازه‌های معمول در مناطق تخلیه صید به طول جبهه ۲۰-۱۵ سانتیمتر هستند.

۱-۳-تکنیک‌های مولکولی و کاربرد آنها جهت بررسی جمعیت و روابط خویشاوندی

امروزه تکنیک‌های مولکولی در بررسی تنوع جمعیتی یا تنوع ژنتیکی در مقایسه با سایر روشهای کلاسیک گذشته به خاطر نشان دادن تنوع و تفاوت‌های بیشتر و همچنین بدلیل آنکه کمتر تحت تاثیر عوامل محیطی قرار گرفته‌اند، کاربرد بیشتری پیدا نموده و نتایج دقیقتری به همراه دارند. با استفاده از روشهای مولکولی بهتر می‌توان تنوع در موجودات را نسبت به سایر روشها (آنالیز صفات کمی و تنوع کروموزومی) نشان داد. ضمناً تحت تاثیر عوامل محیطی نبوده، و از این روشها می‌توان به منظور مقایسه نمونه‌ها از مکانهای متفاوت استفاده نمود. به همین دلیل استفاده از تکنیک RFLP بر روی مولکول DNA بصورت گسترده در اکثر موجودات بخصوص در گونه‌های مختلف آبزیان بکار برده شده است (Ovenden et al., ۱۹۹۷).

تجزیه و تحلیل‌های مستقیم DNA بر اساس توالی نوکلئوتیدهای آن و یا به صورت غیرمستقیم با استفاده از تکنیک RFLP کاربردهای زیادی در مطالعات ماهیان داشته است. به عنوان مثال تخمین پارامترهای

بیولوژیک مانند زمان تخم‌ریزی و مهاجرت ماهیان، معین نمودن ذخایر و ساختار جمعیتی و مطالعه روابط خویشاوندی از این موارد می‌باشند (Willson et al., ۱۹۹۷).

۱-۳-۱-DNA میتوکندری (mtDNA)

ژنوم میتوکندری در حیوانات مختلف بصورت مولکول حلقوی و دو رشته‌ای وجود دارد اما گزارشاتی مبنی بر وجود مولکول خطی در پارامسی (Warrior and Gall, ۱۹۹۵) وجود دارد.

تعداد مولکولهای DNA میتوکندری در بافتهای مختلف متفاوت بوده، بطوری که در سلولهای لنفوسیتی کم بوده (Edward, ۱۹۸۹) ولی دریافت تخمدان زیاد می‌باشد (Chapman and powers, ۱۹۸۴).

اندازه این مولکول (mtDNA) در حیوانات در حدود 16500 ± 500 جفت باز می‌باشد (Moritz و ۱۹۸۷) و *Scallop* (Brown ۱۹۸۳, Clark-Walker, ۱۹۸۵; et al.,) بزرگترین اندازه مربوط به ژنوم میتوکندری می‌باشد (Snyder et al., ۱۹۸۷; Gjetvaj et al., ۱۹۹۲) و کوچکترین سایز این ژنوم مربوط به نماتود می‌باشد (Brown, ۱۹۸۹).

در گونه‌های حیوانی mtDNA در حدود ۳۷ ژن را حمل می‌کند به طوری که ۱۳ ژن از این تعداد ژنهای کد کننده پروتئین، ۲۲ ژن، ژنهای کد کننده tRNA و ۲ ژن کد کننده rRNA موجود دارد به علت تفاوت در مقدار بازهای G+T زنجیره سبک یا L نامیده شده‌اند (Brown, ۱۹۸۱). اغلب ژنها در ژنوم میتوکندری مهره داران بر روی رشته سنگین قرار دارد و فقط ژن ND۶ و ۸ ژن کد کننده tRNA توسط رشته سبک کد می‌شوند. (Meyer, ۱۹۹۳).

در مطالعات مختلف دو منشا پدری و مادری برای mtDNA به اثبات رسیده است اگر چه ژنوم میتوکندری اغلب منشا مادری دارد.

(Avis et al., ۱۹۸۴; و ۱۹۸۳; Avise and landsman) ولی گزارشاتی مبنی بر وجود منشا پدری mtDNA دروزوفیل (*Drosophila*) (Kondo et al., ۱۹۹۰) و حیوانات دیگر نیز وجود دارد.

۱-۳-۲- علت انتخاب mtDNA و DNA هسته‌ای جهت مطالعات ژنتیکی

یکی از دلایل مهم استفاده از روش RFLP بر روی مولکول DNA که بطور گسترده در گونه‌های مختلف آبزیان و همچنین بیشتر حیوانات بکار برده شده است، می‌تواند تفاوت بین ژنوم هسته‌ای و ژنوم میتوکندری و میزان تغییر آنها باشد (Ovenden و ۱۹۹۶). توالی‌های DNA، راهی برای استنباط خویشاوندی‌های تکاملی محسوب می‌گردد بطوریکه با اشتقاق موجودات در طول تکامل، برخی از آنزیم‌های مهم با حفظ عملکرد و وظیفه خود، دچار تغییرات تدریجی و پیش رونده‌ای شدند. بدیهی است هرچه فاصله اشتقاق دومی وجود بیشتر باشد، شباهت آنزیم‌های مناظر آنها به یکدیگر کمتر خواهد بود. بر همین اساس می‌توان با در دست داشتن توالی اسید آمینه‌ای نوعی آنزیم در گونه‌های زیستی مختلف، تقریب معتبری از میزان خویشاوندی تکاملی میان آنها یافت. منبع غنی‌تر اطلاعات خویشاوندی که مانند منبع ذکر شده، از سلولهای زنده قابل استخراج است، توالی‌های نوکلئوتیدی مولکولهای DNA می‌باشد (نورزاد، ۱۳۸۱). امروزه روشهای زیادی برای تجزیه و تحلیل همزمان مقادیر زیادی از توالی‌های DNA و مقایسه آن بین گونه‌های مختلف ابداع شده است. برای پی بردن به ارتباطات خویشاوندی بین موجوداتی که مدتها پیش از یکدیگر مشتق شده‌اند، باید به مقایسه توالی‌های شدیداً حفظ شده‌ای که عملکرد محوری دارند و در خلال تکامل به آهستگی تغییر می‌کنند، پرداخت. حال آنکه توالی‌هایی که به سرعت تغییر کرده تکامل می‌یابند، برای بررسی گونه‌های نزدیکتر، مناسب‌اند. به عبارت بهتر، با استفاده از توالی‌یابی از rRNA، خویشاوندیهای تکاملی موجودات حاصل می‌گردد. چون این ژنها حفاظت شده‌اند، لذا می‌توان از آنها برای اندازه‌گیری ارتباطات خویشاوندی (phylogenetic) استفاده کرد (نورزاد، ۱۳۸۱).

۱-۳-۳- مروری بر تحقیقات مشابه بر روی ژنهای مستقر بر روی mt DNA در جانوران مختلف:

از جمله تحقیقاتی که با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در زمینه جمعیت شناسی و فیلوژنی در موجودات غیرآبزی انجام شده، می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

- مطالعه فیلوژنی بر روی عقاب دریایی با استفاده از mt DNA ژن سیتوکروم اکسیداز (Wink et al., ۱۹۹۶)b.

اولین تحقیق، توسط Avis و همکارانش در سال ۱۹۸۴ با استفاده از DNA و تکنیک RFLP بر روی ماهی Bluegill (*Lepomis macrochirus*) انجام گردید. این تکنیک در سالهای بعد جهت مطالعه ژنتیک

جمعیت سایر گونه‌های ماهیان مهم اقتصادی (Brown, ۱۹۷۹؛ Vpholt and Dawid ۱۹۷۷) میزان تکامل mtDNA در شاخه‌های مختلف جانوران در مقایسه با اغلب مهره داران عالی متنوع می‌باشد. ماهیان مهم اقتصادی مانند مارماهی امریکایی *Angulia rostrate* و نیز گونه‌هایی از ماهیان خاویاری استفاده شد (Rezvani Gilkolaei, ۱۹۹۹, ۲۰۰۰).

در سالهای اخیر استفاده از mtDNA در مطالعات جمعیتی آبزیان، افزایش چشمگیری یافته و مقالاتی در مورد تعیین توالی mtDNA ماهیان، منتشر شده است که از این جمله می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود.

- تعیین توالی نوکلئوتیدی‌های mtDNA کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)
- (CHANG et al., ۱۹۹۴) *Gadus morova*
- مطالعه تنوع mtDNA وال‌ها (Pastene et al., ۱۹۹۷)
- بررسی تنوع mtDNA ماهی King mackerel (Gold et al., ۱۹۹۷) با استفاده از تکنیک PCR-RFLP
- بررسی مولکولی ماهی کاداقیانوس اطلس (Johansen et al., ۱۹۹۴)
- مطالعه مولکولی و بیوشیمیایی ذخایر ماهیان خاویاری در دریای خزر (Rezvani Gilkolaei, ۱۹۹۷)
- (Pourkazemi, ۱۹۹۶)
- بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی *Barbus capito* در استانهای مازندران و گیلان (لالویی، ۱۳۸۲)
- بررسی ژنتیکی جمعیت میگوی سفید (*Metapenaeus affinis*) خلیج فارس و دریای عمان به روش PCR-RFLP بر روی مولکول mtDNA (شجاعی، ۱۳۸۰)
- بررسی مولکولی جمعیت سه گونه میگوی مهم خلیج فارس و دریای عمان (*P.indicus*, *P.merguiensis*, *P.semisulcatus*) با استفاده از مولکول mtDNA به روش RFLP (بابایی، ۱۳۸۰)
- بررسی جمعیت میگوی سفید هندی شرق و غرب جاسک به روش ژنتیکی (بابایی، ۱۳۸۱)
- بررسی جمعیت گونه‌هایی از آزاد ماهیان (Bermingham et al., ۱۹۹۱)
- مطالعه جمعیتی شاه میگو گونه (*Panulirus homarus*) با استفاده از آنالیزهای عددی و مولکولی (محمدی کاشانی، ۱۳۸۱)

- بررسی تنوع ژنتیکی تاسماهی ایرانی در رودخانه سفیدرود با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP روی mt DNA و اطلاعات مورفولوژیکی (عطایی، ۱۳۸۱).

۱-۳-۳-۱- تکنیک‌های DNA

علیرغم استفاده از الکتروفورز پروتئینی، یکسری تکنیک‌های جدید که مستقیماً بر روی DNA به مطالعه می‌پردازند، وجود دارد. روشی که امروزه در سطح DNA وجود دارد، شامل:

- استخراج DNA یا RNA
- تعیین توالی (Sequencing)
- استفاده از آنزیم‌های برشی با استفاده از تکنیک RFLP
- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)
- DNA Fingerprinting که مهمترین خاصیت آن، تشخیص قطعات DNA هر فرد از فرد دیگر است.
- AFLP که روشی ترکیبی از RFLP و RAPD می‌باشد. (طباطبایی، ۱۳۷۲).

۱-۳-۴- آنزیم‌های برشی و مزایای استفاده از آنها

آنزیم‌های برشی (Restriction Enzymes) از مهمترین گروه‌های آنزیم‌ها برای دستکاری DNA بشمار می‌روند که DNA را در محل‌های ویژه‌ای برش می‌دهند. نخستین آنزیم‌های محدود کننده در سال ۱۹۷۰ به صورت خاصی بدست آمد و این امر یکی از مهمترین پیشرفتهای مهندسی ژنتیک بوده این آنزیم‌ها، قیچی‌های مولکولی هستند که DNA را در توالی‌های معینی برش می‌دهند. این آنزیم‌ها در یاخته‌های باکتری‌ها یافت می‌شوند و در آنجا نقش مهمی در حفاظت باکتری بوسیله فرایندهایی به نام اصلاح و محدود کردن (Restriction-modification) ایفا می‌کنند (بهروان، ۱۳۸۲).

آنزیم‌های محدود کننده سه نوع هستند: I, II, III

بیشتر آنزیم‌هایی که امروزه بکار می‌روند از نوع II بوده که کاربرد آنها آسانتر است. نامگذاری آنزیم‌های محدود کننده بر پایه چندین قرارداد می‌باشد که عبارتند از: نام ژنتیکی باکتری، نخستین حرف و نام گونه،

دو حرف پس از آن تعیین می‌کند. ارزش آنزیم‌های برشی از ویژگیهای عمل آنها می‌باشد. هر آنزیم برشی، توالی خاصی را در DNA شناسایی می‌کند.

بکارگیری این آنزیمها آسان است به طوری که میزان مناسبی از آنزیم مورد نظر به محلول DNA در یک بافر افزوده شده و در سال ۳۷ درجه سانتیگراد گرما داده می‌شود. فعالیت آنزیمها با واحد بیان می‌شود، به عبارتی یک واحد فعالیت آنزیم، مقدار آنزیمی است که یک میکروگرم DNA را در یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد تجزیه می‌کند. باید دانست که نوع قطعات DNA که یک آنزیم برشی خاصی ایجاد می‌نماید، به توالی قابل شناسایی بوسیله آنزیم و جایگاه برشی در این توالی بستگی دارد (امین لاری، ۱۳۷۸).

مزایای استفاده از آنزیم‌های برشی بشرح ذیل می‌باشد:

الف) تولید قطعات کوچک از قطعات بزرگ DNA، از آنجا که ژنوم موجودات بسیار بزرگ می‌باشد معمولا محققین بوسیله آنزیمهای برشی DNA موجودات را برش داده و پس از جداکردن قطعات حاصله آنها را جداگانه بررسی می‌نمایند.

ب) تعیین نقشه ژنتیکی بر اساس انگشت نگاری (Fingerprinting): آنزیمهای برشی، مکانهای مختلف DNA را برش می‌دهند لذا به تعیین محل اثر این آنزیمها، انگشت نگاری گفته می‌شود. سپس بر اساس داده‌های حاصل، جایگاه نسبی محل‌های برش را پیدا نموده و نقشه ژنتیکی را برای آن بر اساس وزن مولکولی قطعات DNA رسم می‌نمایند.

ج) استفاده از آنزیمهای برشی با استفاده از تکنیک RFLP:

استفاده از این آنزیمها یکی از سریعترین راههای بررسی‌های ژنتیکی است که بر اساس تکنیکی موسوم به تغییرات طول قطعات حاصل از آنزیمهای برشی یا RFLP (Restriction Fragment length polymorphism) می‌باشد. (Bentzen et al., ۱۹۸۸)

ثابت گردیده که روش PCR-RFLP می‌تواند تکنیک مفیدی برای تجزیه و تحلیل‌های جمعیتی (Hall and Nawrocki, ۱۹۹۵; Cronin et al., ۱۹۹۴) و همچنین برای مطالعات شناسایی گونه‌ها و سیستماتیک (Chow and Inoue, ۱۹۹۳) باشد.

۱-۳-۵- تکنیک (Polymerase Chain Reaction) (PCR):

در روش کلونینگ مولکولی، باید قطعه‌ای از DNA را جهت تکثیر به داخل باکتری وارد نمود. امروزه روش جدید و سریع PCR نام داشته که توسط آن می‌توان مقادیر زیادی از مولکول DNA را در شرایط آزمایشگاهی تکثیر کرد که در سال ۱۹۸۸ توسط کری مولیس (Kary mullis) معرفی شد.

در این روش کاربرد DNA polymerase جهت تکرار کپی برداری از قطعات معین شده از DNA ضروری است. مقدار DNA ساخته شده با این روش بصورت تصاعدی افزایش می‌یابد به طوری که بعد از ۳۰ بار تکرار کپی برداری تعداد (2^{30}) قطعه جدید ایجاد می‌شود که تقریباً یک بیلیون قطعه جدید خواهد بود (n قطعه). این قطعات تولیدی جهت آنالیزهای RFLP یا برای تعیین توالی نوکلئوتیدها و... بکار می‌رود. در این روش با مشخص بودن توالی نوکلئوتیدهای قطعه تکثیر شونده آغازگرهای خاصی طراحی می‌شوند که توانایی شناسایی محل‌های خاصی روی DNA یا قطعات مورد تکثیر را داشته باشند. این آغازگر شامل الیگونوکلئوتیدهای ۱۵ تا ۳۰ بازی بوده که توسط روشهای شیمیایی ساخته می‌شوند (نصیری، ۱۳۸۳).

برای سنتز DNA دو آغازگر بکار می‌رود که از دو قسمت به دو رشته مقابل هم در DNA دو رشته‌ای متصل می‌گردند. واکنش PCR با حرارت دادن نمونه DNA دو رشته‌ای تا حدود ۹۵ درجه سانتیگراد آغاز می‌شود. با این عمل دو رشته DNA از همدیگر جدا می‌شوند. سپس به منظور اتصال آغازگرها به توالی معین از قطعه مورد تکثیر، درجه حرارت کاهش پیدا می‌کند. پس از این عمل، DNA پلیمرز برای ساخته شدن رشته‌های جدید، مورد استفاده آغازگرها قرار می‌گیرد.

حاصل یک چرخه از فرایند تکثیر شامل دو مولکول DNA از مولکول DNA الگو می‌باشد.

این فرایند می‌تواند چندین بار تکرار شود و در هر بار تکرار چرخه قطعات حاصل دو برابر مولکولهای مورد تکثیر اولیه خواهند بود (Copper, ۱۹۹۷).

شایان ذکر است که چرخه‌های حرارتی (شامل افزایش و کاهش دما) در PCR که توسط یکسری بلوک‌هایی که ترموسایکلر نامیده شده و برنامه‌های کنترل حرارتی را اجرا می‌نماید، انجام می‌گیرد.

آنزیم DNA پلیمراز (Tag DNA polymerase) بکار رفته در این واکنش‌ها، مقاوم به حرارت بوده که از باکتری ترموس آکوآتیکوس (*Thermus aquaticus*) موجود در چشمه‌های آب گرم جدا شده است و توانایی مقاومت در برابر درجه حرارتهای بالا را که جهت جدا کردن دو رشته DNA مورد تکثیر لازم است، را دارا می‌باشد.

ضمنای دمای بهینه فعالیت این آنزیم، حدود ۲۷ درجه سانتیگراد است و هیچ فعالیت اگزونوکلئازی $3' \rightarrow 5'$ از این آنزیم دیده نشده است (امتیازی و کریمی، ۱۳۷۸).

از مزیت‌های روش PCR یکی سرعت بالا و دقت زیاد آن است که این مطالعه دقیق تعداد زیادی نمونه را در مدت زمان کوتاهی امکانپذیر می‌سازد.

مزیت دیگر اینکه به مقادیر ناچیز DNA نیاز بوده و همچنین میتوان DNA را از منابع گوناگونی بدست آورد و در بسیاری از موارد، نیازی به کشتن حیوانات جهت نمونه برداری نمی‌باشد. (محمدی و همکاران، ۱۳۷۷).

۱-۳-۵-۱-PCR

ابتدا در این روش دو رشته DNA را با استفاده از حرارت ۹۰-۱۰۰ درجه سانتیگراد (Copper, ۱۹۹۷) از هم باز می‌کنند (مرحله واسرشته سازی Denaturation) و سپس حرارت را بسته به نوع آغازگر پایین آورده تا آغازگرها بتوانند با رشته مکمل خود در DNA جفت شوند (مرحله اتصال آغازگر Annealing) محل جفت شدن آغازگرها طوری است که تکثیر قطعه موردنظر در میان آن دو آغازگر انجام می‌گیرد.

در مرحله بعد دمای واکنش طوری تنظیم می‌شود که برای فعالیت آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت مناسب باشد. در این حالت سنتز DNA با اضافه شدن بازهای موجود در محیط، به انتهای ۳ آغازگر و به عبارت بهتر ساخته شدن رشته‌های جدید از روی رشته الگو انجام شده و قطعه مورد نظر، دو برابر می‌شود (مرحله بسط Extention).

از آنجا که این رشته‌های سنتز شده نیز مکمل آغازگرها هستند، این چرخه حرارتی می‌تواند چندین بار تکرار گردد به همین طریق، سنتز و تکثیر DNA ادامه می‌یابد. مواردی که برای واکنش PCR مورد نیاز می‌باشد، عبارتند از:

دزاکسی نوکلئوتیدها (dNTPs) که هم انرژی و هم واحدهای سازنده را برای سنتز DNA فراهم می‌کند. DNA پلیمراز که معمولاً آنزیم Taq DNA Polymerase می‌باشد، آغازگرها، نمونه DNA و بافری که شامل منیزیم است. pH مطلوب برای فعالیت آنزیم در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، بین ۲/۸ تا ۹ بوده و فعالیت آنزیم در pH کمتر یا بالاتر کاهش می‌یابد (Sweeney and Roper., ۱۹۹۹).

۱-۳-۵-۲-کاربردهای PCR

واکنش PCR به دو دلیل اصلی بکار می‌رود:

الف) تهیه نسخه‌های متعدد از یک ژن، که از آن جهت تعیین ترادف و نیز در ژنتیک جمعیت همراه با تکنیک RFLP برای آشکار نمودن تنوع بین گونه‌ای مهندسی ژنتیک و... استفاده می‌گردد.

ب) بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص در مجموعه ژنی، که در حقیقت علت اصلی گسترش روز افزون این تکنیک در کلیه شاخه‌های مختلف علوم است، در تشخیص سریع عوامل بیماری‌های عفونی،

تشخیص قبل از تولد بیماریهای ژنتیکی، تجزیه و تحلیل مولکولی نمونه‌های تاریخی، تشخیص جهشها، سرطانها، تعیین جنسیت جنین و... استفاده می‌شود.

۱-۳-۵-۳- PCR مشکلات

یکی از مشکلات PCR علی‌رغم مزیت‌هایش، آلودگی (contamination) است. هر قطعه DNA خارجی که وارد محیط PCR می‌گردد بدلیل حساسیت و تکثیر زیاد PCR، تکثیر شده و ممکن است نتایج دور از واقعیتی را بوجود آورد. حساسیت این روش ایجاب می‌کند که مراقبت شدیدی اعمال شود تا از تکثیر آلوده کننده‌هایی مانند DNAهای تکثیر شده از آزمایشهای قبل جلوگیری به عمل آید. محصول PCR یکی از منابع آلودگی اصلی بوده که از طریق تانک الکتروفورز و دستگاه UV به نقاط دیگر آزمایشگاه منتقل می‌گردد. یعنی این مسئله زمانی اتفاق می‌افتد که ژل آگار از تانک الکتروفورز به دستگاه UV منتقل می‌شود لذا باید این دو دستگاه را حداقل فاصله از یکدیگر و در فضای ویژه‌ای که دارای لامپ UV و هواکش است، قرار گیرند و رفت و آمد در این فضا با تعویض کفشها و روپوش انجام گیرد.

۱-۳-۵-۴- عوامل مؤثر در موفقیت برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

۱-۳-۵-۴-۱- واسرشته شدن دو رشته DNA

تفکیک دو رشته DNA در دمای ۹۲-۱۰۰ درجه سانتیگراد صورت می‌گیرد. افزایش دما باعث آسیب دیدن DNA می‌شود و این امر بر تکرارپذیری نتایج مؤثر می‌باشد، بنابراین از دماهای بالا باید اجتناب نمود (Newton, ۱۹۹۷).

به طور معمول در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز برای جداسازی دو رشته DNA دماهای بین ۹۲-۹۵ درجه سانتیگراد استفاده می‌شود اما دمای واسرشته سازی باید براساس الگوهای مختلف DNA باشد (در صورتی که DNA هدف در منطقه هتروکرماتینی قرار داشته باشد، برای جداسازی دو رشته DNA به دماهای بالاتری نیاز می‌باشد) (Newton and Graham, ۱۹۹۷).

۱-۳-۵-۲- چسبیدن آغازگر

محاسبه درجه حرارت چسبیدن آغازگر نقطه آغازین، شروع کارها محسوب شده و عامل مهمی در بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز محسوب می‌گردد. رشته‌های منفرد DNA چنانچه به آرامی سرد شوند، مجدداً بهم متصل می‌گردند چنین اتصال‌هایی کاملاً اختصاصی هستند و رشته‌هایی که از نظر ردیف بازی مکمل‌اند، بهم متصل می‌شوند. در فرآیند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیز هر آغازگر پس از واسرشته شدن DNA الگو به توالی مکمل خود می‌چسبد. شایان ذکر است که درجه حرارت اتصال آغازگر باید بطور عملی و با تکرار آزمایشات بهینه‌سازی شود (Newton, ۱۹۹۷).

۱-۳-۵-۳- توسعه رشته DNA

طول شدن رشته مکمل از 3' OH در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد شروع می‌شود که بهترین دما برای فعالیت آنزیم Taq DNA Polymerase می‌باشد. ایجاد رشته‌های جدید وابسته به میزان فعالیت آنزیم پلیمراز است. در صورتی که قطعه DNA تکثیری بزرگ باشد، می‌توان مدت زمان تکثیر را افزایش داد. اما در اکثر مواقع مدت زمان در دقیقه کافی است. عواملی مانند کاتیونهای دوزرفیتی (از قبیل Mg^{++}) در فعالیت این آنزیم بسیار مؤثرند. در اثر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از هر مولکول دو رشته‌ای DNA، نسخه جدیدی بوجود می‌آید که در واقع همان ناحیه هدف است. هریک از نسخه‌های جدید قادرند دوباره واسرشته شوند و در چرخه دیگر از اتصال و تکثیر رشته‌های مشابه خودشان را تولید نمایند. با تکرار این پدیده قطعه موردنظر بصورت نهایی افزایش یابد (Winnepenninckx et al., ۱۹۹۸).

۱-۳-۵-۴- تعداد چرخه‌ها

تعداد چرخه‌ها را معمولاً بین ۲۵-۳۵ در نظر می‌گیرند و با افزایش تعداد چرخه‌ها، تعداد باندهای مصنوعی افزایش می‌یابد. همچنین به علت کاهش فعالیت آنزیم، تعداد چرخه‌ها را بیشتر از ۴۰ چرخه انتخاب نمی‌کنند.

۱-۳-۵-۴ - Ramping time

مدت زمان لازم برای تغییر از یک مرحله و رسیدن به مرحله بعدی را گویند و بسته به نوع دستگاه ترموسایکلر، متفاوت می‌باشد (Karp, et al., ۱۹۹۸).

۱-۳-۵-۶ - غلظت dNTP ها

dNTP و یون منیزیم مجموعه‌ای را تشکیل می‌دهد که موجب فعالیت آنزیم پلیمرز شده و غلظت این دو ماده، تابعی از یکدیگر می‌باشد.

۱-۳-۵-۷ - کلرید منیزیم ($MgCl_2$)

غلظت $MgCl_2$ در یک واکنش PCR اهمیت زیادی در موفقیت آن دارد. به طوری که اگر این ماده در واکنش وجود نداشته باشد، ممکن است تکثیر اتفاق نیفتد. $MgCl_2$ برای فعالیت آنزیم DNA پلی‌مرز ضروری است و همچنین بر روی آغازگر و DNA الگو تأثیر می‌گذارد. برای تنظیم غلظت $MgCl_2$ در یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز می‌توان غلظت‌های ۱/۵ میلی‌مولار تا ۵ میلی‌مولار را آزمایش کرد. معمولاً غلظت نرمال $MgCl_2$ در واکنش PCR، ۱/۵ مولار است (Wright, ۱۹۸۷). یون Mg^{++} فعالیت DNA پلی‌مرز و اثر متقابل بین آغازگر و الگو را افزایش می‌دهد. کمبود این یون، باعث کاهش بازده و زیادی آن باعث افزایش محصولات غیراختصاصی می‌گردد.

۱-۳-۵-۸ - DNA الگو

غلظت DNA الگو در یک PCR شدت تکثیر را تحت تأثیر قرار خواهد داد. غلظت بالا می‌تواند اثر زیان‌آوری بر روی تکثیر داشته باشد، به این صورت که غلظت بالا به مقدار بیشتری آغازگر و نوکلئوتید برای مرحله بسط مورد نیاز است و محدودیت این عوامل، به شدت تکثیر را کاهش می‌دهد، ضمن اینکه DNA الگو باید در تمام طول خود سالم بوده و از فشار و تنش‌های فیزیکی بخصوص در مراحل کارکردن

با سمپلر بر روی DNA اجتناب گردد. اگر DNA الگو حاوی نسبت بالایی از GC باشد، مشکلاتی در جدا کردن رشته‌ها در دمای بالا (Denaturation) ایجاد خواهد شد (اسدی، ۱۳۸۰).

۱-۳-۵-۹- اضافه کردن تشدید کننده‌های PCR

۱-۳-۵-۱۰- حذف مهارکننده‌های آنزیم از محیط

۱-۳-۵-۱۱- بهتر است که نقطه ذوب آغازگرها شبیه هم باشد (T_m یکسان داشته باشد).

۱-۳-۶- واکنش تکثیر زنجیره DNA با پرایمر اختصاصی

دو آغازگر الیگونوکلئوتیدی که معمولاً از ۱۵ تا ۳۰ باز سنتز می‌شوند و در دو طرف قطعه DNA ایی که باید تکثیر شود قرار می‌گیرند، در تکثیر مولکول DNA به روش PCR دخالت دارند. الیگونوکلئوتیدها، مولکولهای DNA تک رشته‌ای هستند که هر کدام از آنها به رشته مکمل خود در مولکول DNA هدف متصل می‌شوند. محل قرار گرفتن دو پرایمر روی DNA الگو به گونه‌ای است که سنتز قطعه DNA توسط پلی‌مراز بطور موثری باعث تکثیر قطعه موردنظر می‌گردد. بازهای آلی آغازگر باید حدود ۵۰ درصد دارای C+C بوده و حداقل ساختمان ثانویه را داشته باشند و بخصوص در انتهای 3' مکمل نباشند. آغازگرهای طولانی که از ۲۴ تا ۳۰ باز تشکیل شده‌اند، در مرحله اتصال آغازگر (Annealing) در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و بالاتر خوب عمل می‌کند (شیخ‌الاسلامی، ۱۳۷۸).

۱-۳-۷- (Restriction Fragment length Polymorphisms) RFLP

۱-۳-۷-۱- تاریخچه

RFLP اولین بار در سال ۱۹۷۴ به عنوان یک مارکر ژنتیکی توسط Grodzicker و همکارانش برای تعیین جهش در ویروس به کارگرفته شد. استفاده از RFLP به عنوان مارکر ژنتیکی اولین بار توسط Kon و

Dozy (۱۹۷۴) برای آنالیز بیماری کم‌خونی داسی شکل به کار گرفته شد. Botstein و همکاران (۱۹۸۰) تئوری پایه این روش را برای نقشه‌یابی ژنهای مرتبط با بیماری در انسان مطرح کردند (Garmignance, ۱۹۹۸).

Southern در سال ۱۹۷۵ روش انتقال الگوی DNA و نشانگر از ژل به غشاء نیتروسلولزی در RFLP را ابداع نمود. Backman (۱۹۸۶) برای اولین بار استفاده از این نشانگر را مطرح کرد. کاربردهای ممکن همچون نقشه‌یابی و دستکاری مکان‌های ژنهای کنترل شده صفات کمی با استفاده از RFLP در سال ۱۹۸۳ توسط Soller و Backman بیان گردید.

۱-۳-۷-۲- تکنیک RFLP

آنالیز RFLP ناشی از توانایی یک آنزیم محدود کننده در بریدن جایگاههای اختصاصی از توالی نوکلئوتیدها در DNA است. اگر جهشی در جایگاه برش آنزیم واقع شود، جایگاه اختصاصی نسبت به عمل آنزیم پوشیده می‌شود و عمل آنزیم، الگوی جدیدی از قطعات را ایجاد می‌کند. در اینصورت محل شناسایی در توالی DNA چنان تغییر می‌یابد که برش آن توسط آن آنزیم اختصاصی ممکن نیست. این محل‌ها را تحت عنوان «پلی مورفیسم طولی قطعات محدود شده» (RFLP) نامیده‌اند. به عبارتی قطعاتی با اندازه‌های متفاوت که با یک نوکلئاز محدود کننده از آلل‌های مختلف حاصل شده که تحت عنوان RFLP_s نامند.

RFLP_s، در مناطق رمز کننده و مناطقی که فاقد رمز هستند، وجود دارند که این موضوع مشخص می‌نماید که ممکن است تنوع قابل ملاحظه‌ای در ژنوم‌های افراد یک گونه، وجود داشته باشد.

مشخص شده است که ژنوم موجودات به طور طبیعی دارای تفاوت‌هایی در ردیف بازهای خود می‌باشند. این تغییرات طبیعی که باعث گوناگونی در افراد یک جمعیت می‌گردد، پلی مورفیسم نام دارد. اگر پلی مورفیسم در ردیف بازهای DNA در جایگاه شناسایی آنزیم برشی ایجاد شده باشد، به راحتی قابل ردیابی است. RFLP وجود الگوهای غیریکسان است که بر اثر هضم آنزیمی یک ناحیه خاص از DNA بوسیله آنزیمهای برشی مشخص می‌گردد. این الگوهای غیریکسان به علت تفاوت DNA بسته به حضور یا عدم حضور جایگاه آنزیم‌های برشی بوجود می‌آید. این الگوها را به دو شکل می‌توان مشخص کرد.

۱- هضم آنزیمی و سپس الکتروفورز و استفاده از لکه‌گذاری ساترن

۲- PCR قطعه موردنظر و هضم آنزیمی

۱-۳-۷-۳- کاربردهای RFLP

- تشخیص پیش از تولد بیماریهای ژنتیکی با استفاده از نمونه برداری از والدین و جنین (مایع آمنیوتیک و کشت آن)

- بررسی روابط خویشاوندی (Chow and Inoue, ۱۹۹۳)

- تعیین مکان ژنها بر روی کروموزومها

اگر جهشی در جایگاه برشی (Restriction site) آنزیمی ایجاد شود، این جایگاه نسبت به عمل آن آنزیم پوشیده مانده و عمل آنزیم، الگوی جدیدی از قطعات را ایجاد می‌کند ضمناً حالت عکس نیز می‌تواند اتفاق افتد.

۱-۳-۸- روش الکتروفورز مولکول DNA

الکتروفورز، روشی است که با ایجاد میدان الکتریکی، باعث حرکت مولکولهای دارای بار منفی به طرف قطب مثبت و مولکولهای دارای بار مثبت به طرف قطب منفی می‌گردد. جریان الکتریکی بین دو الکترود که داخل باقر قرار دارند، برقرار می‌شود. مولکولهای DNA بدلیل داشتن یونهاى فسفات و همچنین بعلت اتصال مولکولهای SDS دارای بار منفی به آنها، در میدان الکتریکی الکتروفورز به طرف قطب مثبت حرکت می‌کنند و چون سرعت حرکت قطعات سبکتر، بیشتر از سرعت حرکت قطعات سنگین‌تر است، لذا قطعات مختلف مولکولهای DNA با الکتروفورز از هم جدا می‌شوند.

۱-۳-۸-۱- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز

روش استاندارد الکتروفورز ژل آگارز که برای بررسی و تفکیک قطعات DNA بکار می‌رود، ساده و سریع بوده و توانایی جداسازی قطعاتی از DNA را که توسط سایر روشها نمی‌توان آنها را به آسانی جدا نمود را دارا می‌باشد.

تشخیص موقعیت و محل DNA در ژل توسط رنگ آمیزی با غلظت‌های پائین رنگ فلورسانس اتیدیوم بروماید و مشاهده مستقیم آن تحت تابش UV صورت می‌گیرد (Sharp, ۱۹۸۷) همچنین امکان بازیافت DNA از روی ژل آگارز وجود دارد.

از آنجا که طول قطعه تکثیر شده توسط هر آغازگر با آغازگر دیگر متفاوت است، لذا برای بررسی نتیجه هر نوع محصول PCR باید از ژل آگارز با درصد خاصی استفاده شود.

آگارز، آگار تخلیص شده از نوعی جلبک دریایی قرمز بوده و پلی ساکاریدی متشکل از مونومرهای (D گالاکتوز، ۳ و ۶ آنهیدرو L گالاکتوز) (D-galactose-۳,۶-anhydro L-galactose) یک کورنیدی متصل می‌باشند. آگارز در آب گرم محلول بوده و در غلظت‌های ۰/۵ تا درصد وزنی به حجمی، پس از سرد شدن به صورت یک ژل درآمده و زنجیره‌های پلیمر، با ایجاد باندهای هیدروژنی، اشکال ضربدری (Cross linking) را تشکیل می‌دهند.

ژل‌های آگارز، معمولاً در موقعیت افقی در میدان الکتریکی قرار داده می‌شوند که بعد از قراردادن (Load) نمونه‌ها در چاهک‌های موجود بر ژل و اتصال به منبع جریان الکتریکی (EPS) قطعات DNA در حضور محلول‌های بافری مناسب بر اساس اندازه و شکل خود به طرف الکترود مثبت حرکت کرده و باعث جداکردن قطعات DNA می‌شوند.

بر طبق جدول زیر هر چه درصد غلظت آگارز در ژل کمتر باشد، توانایی بیشتری برای تفکیکی قطعات DNA با طول بیشتر دارد. (Bernend Sue Ann et al., ۲۰۰۰)

Amount of agarose in gel (% [W/V])	Efficient range of separation of linear DNA molecular (Kb)
۰/۳	۵-۶۰
۲/۶	۱-۲۰
۲/۷	۰/۸-۱۰
۰/۹	۰/۵-۷
۱/۲	۰/۴-۶
۱/۵	۰/۲-۳
۲/۰	۰/۱-۲

جدول محدوده تفکیکی DNA در ژل‌های آگارز با درصدها متفاوت وزنی / حجمی



۱-۳-۸-۲- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید (PAGE)

با توجه به اینکه قدرت تفکیک باندها در ژل پلی آکریل آمید نسبت به ژل آگارز بهتر است، لذا از این نوع الکتروفورز برای جداکردن قطعات با وزن مولکولی پائین (کمتر از ۱۰۰۰ جفت باز) استفاده می‌شود، چون اندازه منافذ موجود در بافت ژل، کوچک است.

اساس کار این دستگاه مشابه کار الکتروفورز ژل آگارز می‌باشد و اختلاف آنها در شکل ظاهری دستگاه، نوع ژل و کاربردهای آن است، بطوریکه در این دستگاه یک الکتروود در بالا و الکتروود دیگر در پائین محفظه قرار گرفته و هر دو الکتروود توسط بافر الکتروود احاطه می‌شوند و تنها مسیر عبور جریان الکتریکی و جریان الکترونها بین این دو الکتروود از طریق ژل می‌باشد.

۱-۳-۸-۳- روشهای آشکارسازی باندهای DNA

رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید (ETBR):

این ماده بعد از اتصال به بازهای آلی خاصیت فلورسانس پیدا کرده و در مقابل نور UV (فرابنفش) به رنگ نارنجی دیده می‌شود.

- استفاده از خاصیت رادیواکتیو
- اضافه کردن فسفر رادیواکتیو
- اضافه کردن کربن رادیواکتیو
- رنگ آمیزی نیترات نقره

۱-۳-۸-۴- تعیین وزن مولکولی قطعات بدست آمده

برای تشخیص وزن مولکولی باند یا باندهایی که بعد از الکتروفورز دیده می‌شوند و نشان دهنده قطعاتی از DNA می‌باشند، بهترین روش استفاده از نشانگر DNA است که با قراردادن این نشانگر در کنار نمونه‌ها، می‌توان وزن مولکولی قطعات DNA ایجاد شده را تخمین زد. این نشانگرها، ژنوم باکتریهای خاصی بوده که توسط آنزیمهای مختلف به قطعات متعدد با وزن مولکولی مشخص، برش داده شده‌اند.

با قرار دادن مارکر در کنار نمونه‌های مجهول و با آگاهی از وزن مولکولی قطعات ایجاد شده در ستون نشانگر، نمونه‌های با وزن مولکولی مجهول که هم ردیف با هر یک از قطعات ستون نشانگر باشند، وزن مولکولی همان نشانگر را دارا خواهد بود.

۱-۳-۹- نگاهی گذرا بر انواع نشانگرها

تعریف نشانگر: توالی DNA یا هر صفتی که بتواند برای تشخیص و شناسایی گونه، جمعیت، افراد یا واریته‌ها بکار رود، به عنوان نشانگر در نظر گرفته می‌شود. به عبارت دیگر، تفاوت موجود بین ردیف DNA کروموزومی هر ارگانیسم که از والدین به فرزندان منتقل می‌شود، بعنوان نشانگر ژنتیکی تلقی می‌گردد (صنعی و همکاران، ۱۳۷۴).

۱-۳-۹-۱ طبقه‌بندی نشانگرهای ژنتیکی

پیشرفتهایی که در سالهای اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی صورت گرفته، ابزار سودمندی را برای مطالعات ژنتیک موجودات عالی، بخصوص گونه‌های آبزیان فراهم نموده است. شاید اساسی‌ترین ابزار، نشانگرهای DNA باشند که درحقیقت همان تفاوت‌های قابل ثبت اطلاعات ژنتیکی (ردیف‌های بازی DNA) موجود بین دو یا چند نمونه می‌باشند. عمده‌ترین کاربرد این اطلاعات در پزشکی، پزشکی قانونی، ژنهای مقاوم به بیماریها، مطالعات ژنتیک تکاملی و روابط خویشاوندی، تشخیص والدین، اصلاح نژاد و ... می‌باشد.

اختلاف بین کروموزوم‌های دو فرد و توالی DNA می‌تواند بوسیله روشهای مختلفی ردیابی گردد. بعضی از این اختلافات به صورت ظاهر در فنوتیپ فرد نمایان می‌شود (نشانگرهای قابل رویت). بعضی با آزمایش یک آنزیم (ایزوزیم/آلوزیم) از بافتهای مختلف و بعضی از این اختلافات از طریق تجزیه و تحلیل DNA (نشانگرهای DNA) قابل مشاهده است. برای اینکه صفتی نشانگر ژنتیکی محسوب گردد، باید دارای دو خصوصیت باشد:

۱- صفت باید بین والدین متفاوت باشد

۲- صفت دقیقاً به ارث برسد

به عنوان مثال، گروههای خونی، اغلب بین دو والد متفاوت می‌باشند اما دقیقاً به ارث می‌رسد بنابراین گروههای خونی مختلف بعنوان یک نشانگر ژنتیکی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. در مقابل قد بین دو والد در اغلب موارد متفاوت است اما قد والدین معمولاً به طور دقیق به اعقاب منتقل نمی‌شود، لذا صفت قد افراد نمی‌تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی مفید باشد (بجز مواردی مانند کوتولگی ژنتیکی).

۱-۳-۹-۱- نشانگرهای مرفولوژیک

نشانگرهای مرفولوژیک، به طور مستقیم در فنوتیپ جانور و گیاه قابل تشخیص بوده و توارث پذیر هستند. (مزدانی، ۱۳۷۲). مانند: فلسها، اتولیت‌ها، انگل‌ها و ترکیب عنصری قسمتهای مختلف بدن. گرچه نشانگرهای مرفولوژیک به طور سنتی در علوم زیستی استفاده شده‌اند، اما محدودیتهایی نیز دارند که عبارتند از:

کم بودن تعداد این نشانگرها (Morgan, ۱۹۶۱)، دقت کم، مرحله رشد و سن و غالبیت در بروز. اساس ژنتیکی و تفسیر بسیاری از آنها نامشخص بوده و شناسایی افراد خالص و ناخالص ممکن نیست. اما به دلیل ساده و کم هزینه بودن و عدم نیاز به امکانات پیچیده، بسیاری از محققین از این نشانگرها استفاده می‌نمایند.

۱-۳-۹-۲- نشانگرهای سیتولوژیک

در بسیاری از موجودات زنده، اعم از گیاه و جانور، تفاوت‌هایی در گستره کروموزومی مشاهده می‌شود. از این گروه نشانگر می‌توان به ایزوکروموزومها، جابجایی‌ها، الگوی نواریندی اشاره نمود.

۱-۳-۹-۳- نشانگرهای بیوشیمیایی

برخی از تفاوت‌های موجود در ردیف DNA بین دو موجود ممکن است به صورت پروتئین‌های با اندازه‌های مختلف ظهور نماید و از راههای مختلف بیوشیمیایی، قابل رؤیت، ثبت و مطالعه گردند. این قبیل نشانگرها را نشانگرهای مولکولی در سطح پروتئین (بیوشیمیایی) می‌نامند. به هنگام بکارگیری الکتروفورز، پروتئین‌ها براساس کل بار خالص الکتریکی و اندازه مولکول که برای هریک معین و ویژه است و با سرعت

معینی که به این دو عامل بستگی دارد، به طرف قطب مثبت حرکت می‌نمایند. تنوع و گوناگونی یک پروتئین معین انعکاس جابجایی و جایگزینی اسیدهای آمینه در زنجیره پلی‌پپتید است. جابجایی اسید آمینه در پروتئین، بار الکتریکی پروتئین و در نتیجه حرکت آن را در سیستم الکتروفورز بر حسب نوع و تعداد اسید آمینه‌های جابجا شده، تغییر می‌دهد. آلوزیم‌ها و ایزوزیم‌ها، از این قبیل نشانگرها هستند. عیوب نشانگرهای بیوشیمیایی عبارتند از:

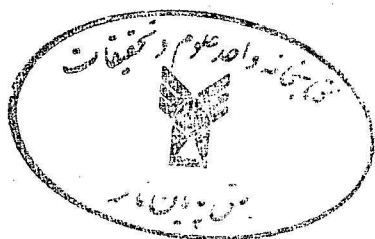
- ۱- روشهای رنگ‌آمیزی آنها چندان زیاد نیست
- ۲- تعداد مارکرهای بیوشیمیایی محدود است
- ۳- محدودیت تنوع ژنتیکی در این نشانگرها
- ۴- پیچیدگی تحلیل فنوتیپ‌های الکتروفورزی
- ۵- به نمونه‌های تازه نیاز دارد که در شرایط خاص باید جمع‌آوری و در سرمای مناسب حمل و نگهداری شود.

۱-۳-۹-۴- نشانگرهای DNA

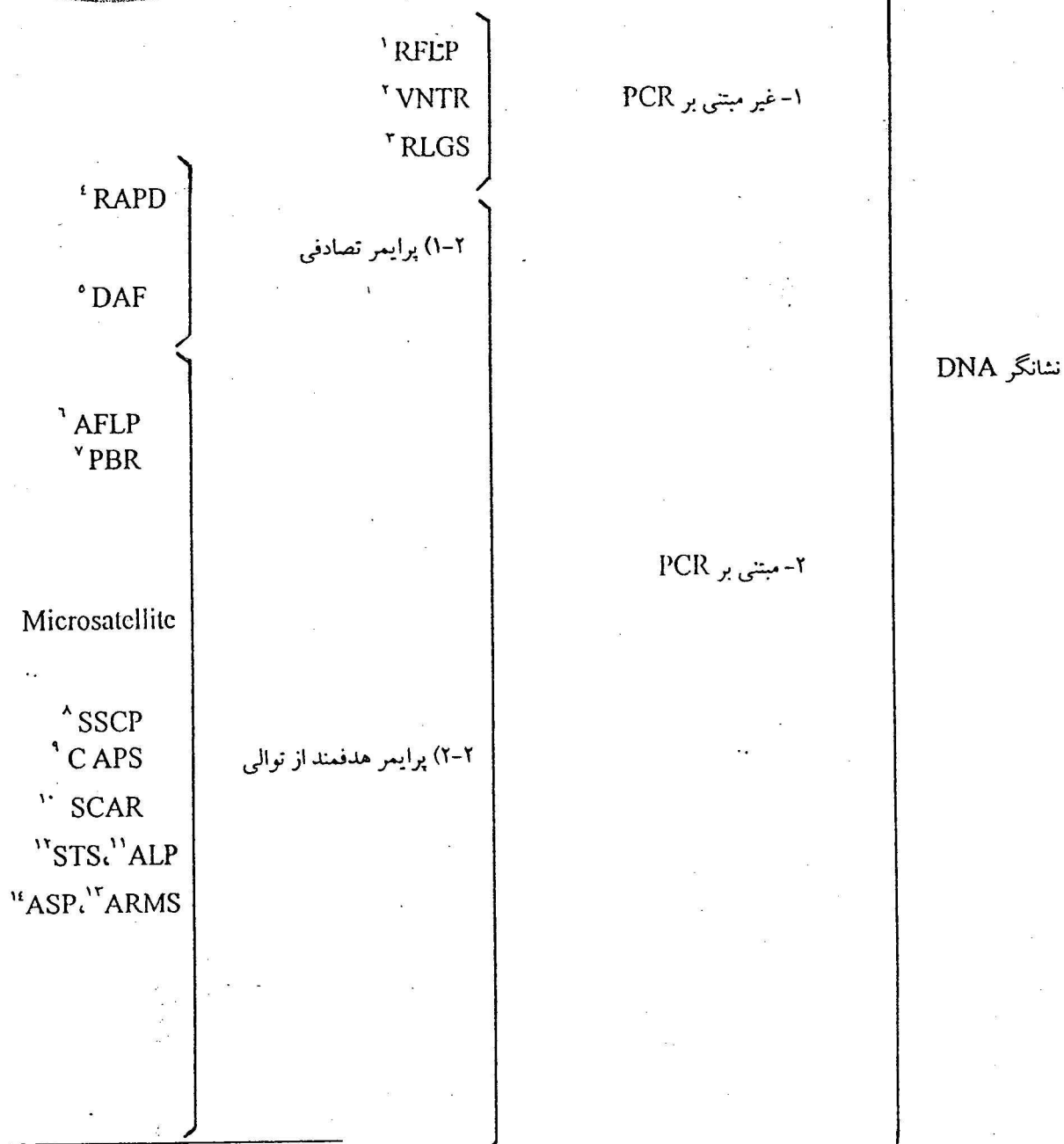
پلی‌مورفیسم پروتئین‌ها در واقع انعکاس غیرمستقیم یا بروز چندشکلی ساختمان DNA و ژنها می‌باشد. نشانگرهای DNA، تفاوت قابل ملاحظه‌ای با نشانگرهای پروتئینی و مرفولوژیک داشته و دارای مزایایی بشرح زیر است:

- ۱- دقت و سهولت تعقیب آنها
- ۲- امکان بکارگیری آنها در مراحل اولیه زندگی موجود
- ۳- فراوانی فوق‌العاده این نشانگرها
- ۴- امکان استفاده از برنامه‌های کامپیوتری مانند Gene Runner و Oligo برای تجزیه و تحلیل نتایج.
- ۵- عدم تأثیرپذیری از شرایط داخلی و خارجی موجود

(در صفحات بعد دسته‌بندی نشانگرهای DNA و طرح باندهای DNA Ladder ۱۰۰bp ارائه شده است).



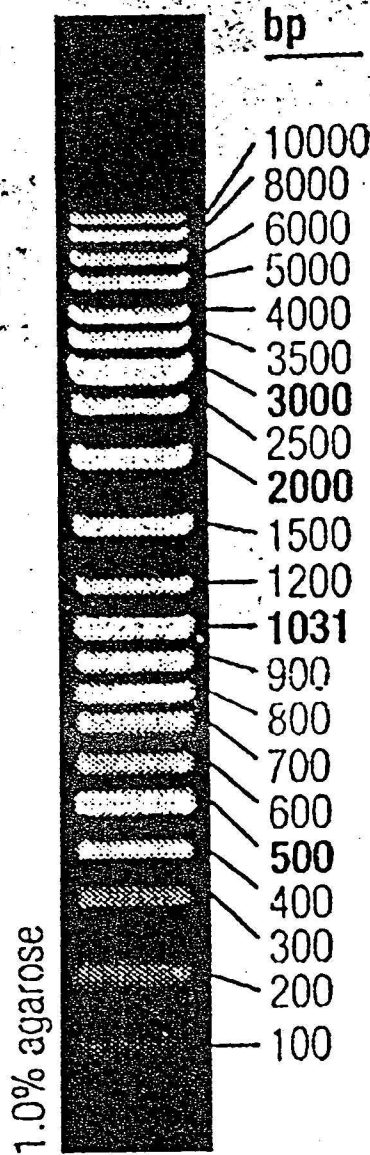
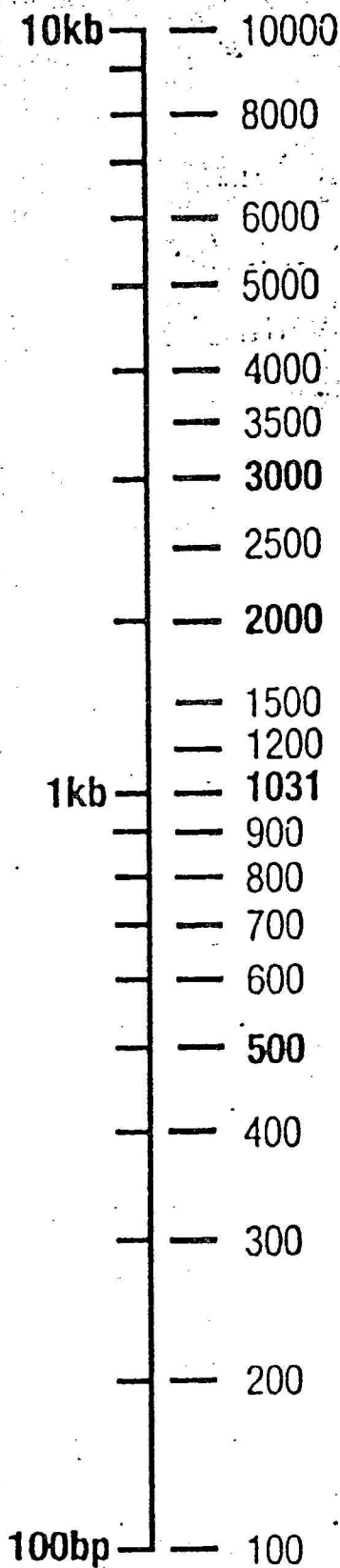
دسته بندی نشانگرهای DNA



1. Restriction Fragment Length Polymorphism
2. Variable Number Of Tandem Repeat
3. Restriction Landmark Genomic Scanning
4. Random Amplified Polymorphism DNA
5. DNA Amplification Fingerprinting
6. Amplified Fragment Length Polymorphism
7. PCR-RFLP
8. Single Strand Conformation Polymorphism
9. Cleavable Amplified Polymorphism Sequence
10. Sequence Characterized Amplified Region
11. Amplified Length Polymorphism
12. Sequence Tagged Site
13. Amplification Refactory Mutation System
14. Allel Specific PCR

GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use

Fragment Sizes



0.5µg/lane,
8cm length gel,
1X TAE, 17V/cm



100bp DNA Ladder طرح باندی

فصل دوم

مواد و روشها



در این تحقیق، تعداد ۳۴۰ نمونه ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) از ۱۵ ایستگاه نمونه برداری در خلیج فارس و دریای عمان جهت تعیین تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت آن که بوسیله روش‌های ترال کف و قفس سیمی (گرگور) بدست آمده‌اند، مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از فیکس نمودن نمونه‌ها در ظروف نمونه برداری حاوی الکل اتیلیک خالص (محلول فیکساتور) و ارسال آنها به مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مراحل بعدی آزمایشات که شامل استخراج DNA و تکثیر ژن rRNA، ۱۸S توسط تکنیک PCR و هضم آنزیمی محصولات PCR توسط RFLP می‌باشد انجام گردید.

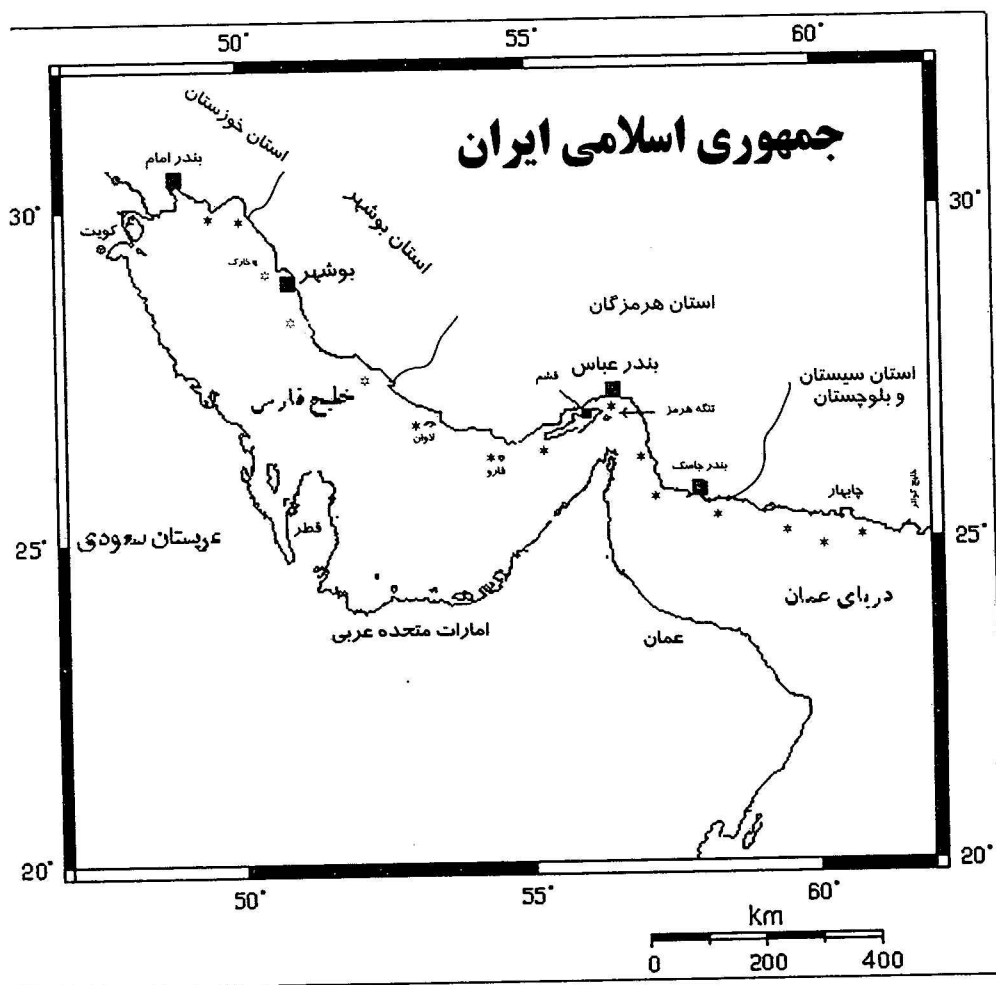
۲-۲-دستگاههای مورد نیاز

دستگاههای مورد نیاز در این تحقیق عبارتند از:

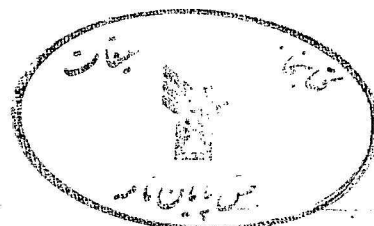
- دستگاه مولد چرخه حرارتی یا ترمال سایکلر (Thermal cycler) مدل Eppendorf
- سانتریفوژ (Centrifuge) مدل Hetich
- ترازوی دیجیتال با دقت ۰،۱mg
- شیکر چرخان (shaker) مدل Akhtarian
- pH متر دیجیتالی مدل pH۵۲۳-WTW
- الکتروفورز افقی مدل Akhtarian
- الکتروفورز عمودی مدل Akhtarian
- ژل داکيومنتیشن (photo Man Direct Gel Documentation) مدل Uvitec
- بن ماری
- انکوباتور
- فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد
- همزن (Vortex)
- اولتراترانسیلو میناتور (Ultratran Silluminator)

۲-۳- نمونه برداری

نمونه برداری از ۱۵ ایستگاه ذکر شده واقع در آبهای خلیج فارس و دریای عمان در طی سالهای ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳ انجام شد و اقدامات لازم برای مراحل بعدی بر روی آن انجام گرفت. (در شکل صفحات بعد ۱۵ منطقه جهت نمونه برداری در آبهای خلیج فارس و دریای عمان و مشخصات آنها ارائه شده است).



در شکل بالا ۱۵ منطقه مورد بررسی (۳ منطقه در آهای استان س وب - ۷ منطقه در آهای استان هرمزگان - ۳ منطقه در آهای استان بوشهر - ۲ منطقه در آهای استان خوزستان) جهت نمونه برداری در آهای خلیج فارس و دریای عمان نشان داده شده است.



مشخصات ۳ ایستگاه مورد بررسی در آبهای استان سیستان و بلوچستان

شماره ایستگاه	تعداد نمونه‌ها	طول و عرض جغرافیایی	شروع ساعت تورکشی	پایان ساعت تورکشی	عمق
۱	۳۰	۲۵° ۰۲' ۶۰° ۵۸'	۲۱/۳۰	۲۳/۵۰	۷۵ متر
۲	۳۵	۲۴° ۰۲' ۶۰° ۵۵'	۱۷/۴۵	۲۰/۱۵	۱۱۰ متر
۳	۲۵	۲۵° ۰۲' ۵۹° ۴۳'	۱۶/۳۰	۱۹/۳۰	۶۵ متر

- مشخصات ۷ ایستگاه مورد بررسی در آبهای استان هرمزگان

شماره ایستگاه	تعداد نمونه‌ها	طول و عرض جغرافیایی	شروع ساعت تورکشی	پایان ساعت تورکشی	عمق
۴	۲۰	۲۵° ۱۰' ۵۸° ۲۵'	۱۵/۲۵	۱۸/۳۰	۷۵ متر
۵	۲۴	۲۵° ۳۰' ۵۷° ۰۸'	۱۱/۳۰	۱۴	۵۵ متر
۶	۱۶	۲۶° ۰۸' ۵۶° ۴۳'	۹/۴۲	۱۱/۲۵	۴۵ متر
۷	۲۳	۲۷° ۰۶' ۵۶° ۱۱'	۱۰/۳۸	۱۲/۳۶	۳۰ متر
۸	۲۲	۲۶° ۰۵' ۵۵° ۲۱'	۵/۱۵	۷/۳۰	۳۵ متر
۹	۱۷	۲۶° ۰۳' ۵۴° ۰۲۱'	۳/۱۰	۵/۴۹	۴۰ متر
۱۰	۱۸	۲۶° ۳۹' ۵۳° ۲۱'	۲۲/۵۰	۱۳/۲۰	۳۵ متر



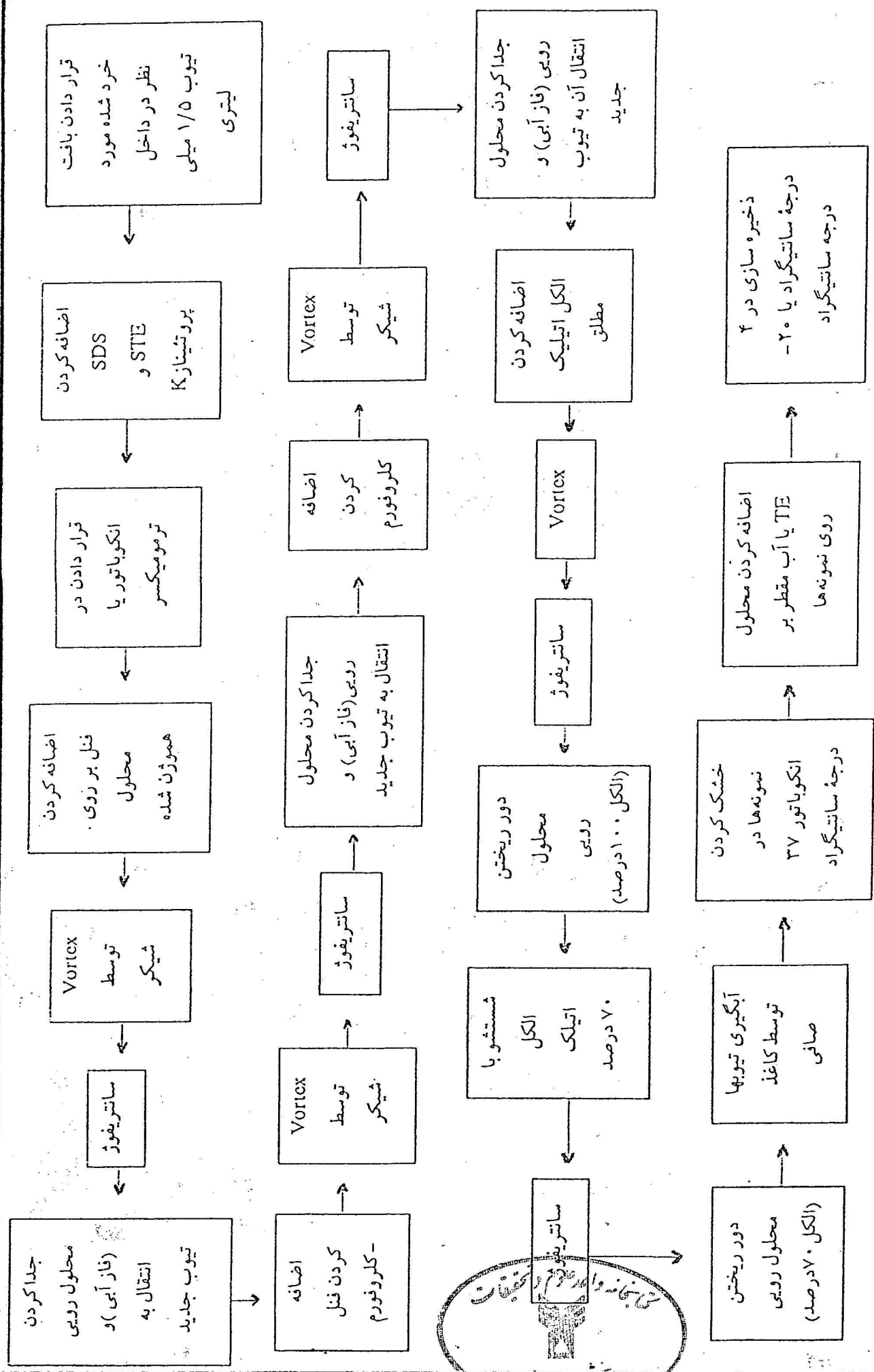
- مشخصات ۳ ایستگاه مورد بررسی در آبهای استان بوشهر

شماره ایستگاه	تعداد نمونه‌ها	طول و عرض جغرافیایی	شروع ساعت تورکشی	پایان ساعت تورکشی	عمق
۱۱	۲۰	۲۷° ۱۱' ۵۳° ۲۸'	۱۲/۵۸	۱۴/۲۳	۴۵ متر
۱۲	۲۸	۲۸° ۱۸' ۵۱° ۰۴'	۱۹/۲۴	۲۱/۳۰	۳۵ متر
۱۳	۱۲	۲۹° ۰۳' ۵۰° ۴۸'	۲۲/۱۹	۲۳/۵۵	۳۰ متر

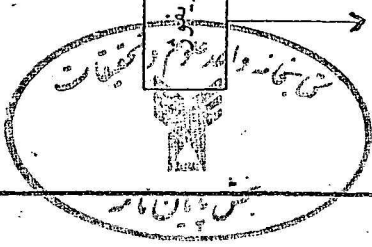
- مشخصات ۲ ایستگاه مورد بررسی در آبهای استان خوزستان

شماره ایستگاه	تعداد نمونه‌ها	طول و عرض جغرافیایی	شروع ساعت تورکشی	پایان ساعت تورکشی	عمق
۱۴	۲۳	۲۹° ۵۰' ۵۰° ۰۲'	۱۳/۲۰	۱۵/۱۵	۳۵ متر
۱۵	۲۷	۲۹° ۴۸' ۴۹° ۲۱'	۱۸/۵۷	۲۰/۴۶	۲۵ متر





مراحل مختلف استخراج DNA از نمونه ها به روش فیل - کلروفرم



۲-۳-۱- مواد و وسایل مورد نیاز نمونه برداری

- کشتی‌های تحقیقاتی فردوس یک (مجهز به تورترال کف)، لاور و تجلی
- ظروف نمونه برداری و بر چسب
- الکل اتیلیک ۹۶ درصد (محلول فیلکساتور)
- کیف مخصوص نمونه برداری (شامل قیچی استریل و اسکالپر)

۲-۳-۲- روش و محل های نمونه برداری

نمونه برداری از اعماق ۱۰-۱۱۰ متری در ۱۵ ایستگاه مشخص شده (۳ ایستگاه در آبهای استان سیستان و بلوچستان، ۷ ایستگاه در آبهای استان هرمزگان، ۳ ایستگاه در آبهای استان بوشهر و ۲ ایستگاه در آبهای استان خوزستان) به روش ترال کف و همچنین استفاده از قایقهای صیادی محلی مجهز به قفس سیمی (گرگور)، انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از صید در داخل ظروف نمونه برداری حاوی الکل اتیلیک ۹۶ درصد تثبیت گردید و به آزمایشگاه مربوطه انتقال داده شد.

۲-۴- استخراج DNA به روش فنل - کلروفرم (Hillis and Moritz, ۱۹۹۰)

برای استخراج DNA روشهای مختلفی وجود دارد که دراین تحقیق برای بدست آوردن DNA با کیفیت و کمیت مناسب جهت انجام PCR از روش فنل - کلروفرم استفاده گردید. در این روش ابتدا ۵۰-۱۰۰ میلی گرم از بافت تثبیت شده در اتانول خالص را بصورت خرد شده در داخل تیوپ‌های ۱/۵ میلی لیتری قرار داده و سپس بر روی آن مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر STE (طرز تهیه محلول‌های بکار رفته در ضمیمه آورده شده است) ریخته شد. تا قطعات خرد شده معلق گردند. پس ۵۰ میکرولیتر از بافر SDS ۱۰٪ (سدیم دودسیل سولفات) و ۵ میکرولیتر پروتئیناز K (۱۰ mg/ml) به آن اضافه کرده و تیوپ حاوی نمونه را به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه بر روی شیکر (shaker) قرار داده شد تا به حل شدن بافتها کمک شود به مدت ۸-۱۰ ساعت در بن ماری ۵۵ درجه سانتیگراد گذاشته شد. پس از مرحله هضم سلولی، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از فنل تعدیل شده بر روی نمونه‌ها اضافه کرده و با همزن (Vortex) همزده شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر با دور ۱۰۰rpm عمل همزن ادامه یافت. پس از این مدت، نمونه را در سانتریفوژ با دور

۱۳۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه قرار داده و بعد از تشکیل دو لایه در داخل تیوپ، لایه رویی را به دقت و به آرامی جدا نموده و بوسیله سمپلر از آن به داخل تیوپ لایه رویی را به دقت و به آرامی جدا نموده و بوسیله سمپلر از آن به داخل یک تیوپ استریل دیگر منتقل گردید.

سپس ۲۵۰ میکرولیتر از فنل و ۲۵۰ میکرولیتر از کلروفرم را به داخل تیوپ جدید ریخته و بعد از چند بار بهم زدن با دست، ب مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۲۰۰ rpm سانتریفوژ انجام شد. مجدداً بعد از جدا نمودن لایه رویی آنرا در تیوپ دیگری ریخته، سپس ۵۰ میکرولیتر سدیم استات ۳ مولار (غلظت نهایی ۰/۳ ر مولار) و دو برابر حجم آن، الکل مطلق اضافه کرده و ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. الکل را حذف کرده و رسوب DNA را با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد. بعد از خشک شدن رسوب، مقدار ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد و به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا DNA حل شود.

۲-۴-۱- مواد مورد نیاز

- بافر STE (شامل NaCl , Tris-Hcl , EDTA)

- بافر SDS ۱۰٪ (Sodium Dodecyl Sulfate)

- آنزیم پروتئیناز K با غلظت ۱۰ mg/ml ساخته شده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می شود.

- الکل اتانول ۱۰۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد: این محلول ها باید برای استخراج DNA سرد باشند ، لذا در یخچال نگهداری شدند.

- محلول فنل - کلروفرم: با نسبت ۲۵: ۲۴ تهیه شده و در ظروف تیره و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

- استات سدیم با pH = ۵/۲ و غلظت ۳ مولار DNA هدف

- اتیدیوم بروماید (EtBr) با غلظت ۱۰ mg/ml (Sigma)

- مخلوط dNTP با غلظت ۲ mM شامل :

dATP (دزوکسی آدنوزین تری فسفات)، dGTP (دزوکسی گوانوزین تری فسفات)، dATP (دزوکسی

تیمیدین تری فسفات) و dGTP (دزوکسی سیتوزین تری فسفات)

- فرمالدئید ۳۷٪

- فنل ($\text{pH} = 7/8 - 8/2$)

- Δ Hydroxy quinoline

- MgCl_2

- کلروفرم (Merk)

- سرسمپلر (Treff)

- میکروتیوب ۱/۵ و ۰/۵ میلی لیتری (Treff)

- آب مقطر استریل

- دستکش یکبار مصرف

۲-۵- بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده

جهت انجام PCR لازم است کمیت و کیفیت DNA استخراج شده مشخص گردد. برای این منظور از

روش الکتروفورز افقی استفاده شده است.

۲-۵-۱- روش الکتروفورز افقی

۲-۵-۱-۱- مواد مورد نیاز

- پودر آگارز

- محلول TBE ($10 \times$) شامل Tris، اسید بوریک و EDTA

- بشر مقاوم در برابر حرارت

- محلول رنگی اتیدیوم بروماید (EtBr)

- بافر سنگین کننده LB (Loading buffer) شامل گلیسرول، EDTA و بروموفنل بلو

۲-۱-۵-۲- روش تهیه ژل آگارز ۱/۵ درصد

جهت آماده کردن ژل آگارز ۱/۵ درصد با دانستن حجم ظرفی که ژل در آن ریخته می شود و مقدار ۰/۱۵ گرم آگارز (W/V) را در محلول TBE (۱×) و آب مقطر که نسبت ایندو حدود ۱ به ۳ می باشد، حل شد. این ترکیب روی شعله قرار گرفته تا زمانی که رنگ آن شفاف گردد. بعد از کاهش درجه حرارت، به میزان ۱ میکرولیتر اتیدیوم بروماید (۱۰ mg/ml) (EtBr) به ازاء هر ۱۰ میلی لیتر آگارز بر روی محلول اضافه کرده و هم زده شد. محلول نسبتاً سرد شده، داخل ظرف الکتروفورز حاوی شانه ریخته شد. ظرف ژل را در مکانی که تراز یکنواخت دارد قرار داده تا به بسته شدن یکنواخت ژل کمک نماید. بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه ژل سفت شده و شانه را از داخل خارج نموده و ژل را در داخل تانک الکتروفورز افقی قرارداده شد. بافر مزبور حاوی ۵۰ درصد ماده سنگین کننده مانند گلیسرین یا ساکارز است تا نمونه بخوبی داخل چاهک ریخته شود و همچنین حاوی ۰/۲ درصد از رنگ بروموفنل بلو می باشد که در این ژل، همراه با ۵۰۰ bp حرکت می کند.

۲-۱-۵-۳- روش کار

پس از تهیه نمودن و قراردادن ظروف الکتروفورز حاوی ژل آگارز ۱/۵ درصد در تانک الکتروفورز، ۱۰ میکرولیتر از DNA را به همراه ۲ میکرولیتر بافر سنگین کننده در داخل گودی های ایجاد شده در ژل وارد نموده تا الکتروفورز شود. الکتروفورز به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه و با ولتاژ ۱۰۰ V انجام شد. آنگاه ژل را از دستگاه خارج نموده و جهت بررسی کیفیت DNA و تاحدودی کمیت DNA، آنرا زیر اشعه UV (با استفاده از سیستم مستندسازی ژل) قرارداده تا با استفاده از خاصیت فلورسنت ایجاد شده و از روی شدت باند تشکیل شده، باند DNA ارزیابی گردد.

۶-۲- طراحی آغازگر

جهت طراحی آغازگرها، در مرحله اول لازم است که از توالی نوکلئوتیدی ژن rRNA ۱۸s اطلاع حاصل شود. این اطلاعات از طریق جستجو در اینترنت (برگرفته از سایت اینترنتی ncbi) بدست آمد (Accession AF ۳۶۹۱۱۷). سپس براساس این توالی، آغازگرهای موردنظر طراحی گردید. آغازگر رو به عقب R (Reverse) دارای ۲۴ باز و آغازگر رو به جلو F (Forward) دارای ۲۵ باز می باشد که مشخصات آنها به قرار زیر است:



با استفاده از این دو آغازگر، محصول PCR دارای ۵۰۲ جفت باز می باشد. قابل ذکر است که آغازگرهای مذکور توسط شرکت Primm کشور کره جنوبی ساخته شدند.

مواردی که برای طراحی آغازگرها در نظر می گیرند عبارتند از:

- طول آغازگر: بین ۱۷ تا ۲۸ باز باشد.
- ترکیب نوکلئوتیدها: شامل ۶۰-۵۰٪ G + C باشد.
- درانتها 3' بیشتر از ۲ باز C یا G نباشد.
- در انتهای 3' آغازگرهای مورد استفاده نباید باهم مکمل باشند.
- دمای ذوب در حدود ۸۰-۵۵ درجه سانتیگراد باشد

۷-۲- PCR ژن rRNA ۱۸s

جهت تکثیر ژن rRNA ۱۸s از تکنیک PCR استفاده گردید که باتوجه به آزمایشات متعددی که برای تنظیم مقادیر هریک از مواد موردنیاز انجام شد، انجام PCR بعداز آماده سازی مواد و دستگاه چرخه مولد حرارتی (Thermal Cycler) صورت پذیرفت. برای اینکار به میزان ۱۰۰ نانوگرم RNA استخراجی، ۴۰ پیکومول از هریک آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب، ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰mM)، بافر PCR (۱۰ ×)، ۱واحد (unit) آنزیم Tag DNA Polymerase، ۱/۵ میلی مولار Mgcl₂ (۵ mM) استفاده شد که درنهایت حجم نهایی با آب مقطر به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس تیوب ها را در دستگاه چرخه



مولد حرارتی (ترموسایکلر مدل Primus شرکت MWG آلمان) قرار داده و PCR به شرح ذیل انجام شود:

مراحل	زمان	دما	شرایط
مرحله اول، یک چرخه	۵ دقیقه	۹۴ درجه سانتیگراد	واسرشته سازی اولیه (Denaturation)
مرحله دوم، ۳۰ چرخه هر چرخه شامل:	۳۰ ثانیه	۹۴ درجه سانتیگراد	Denaturation
	۳۰ ثانیه	۵۷ درجه سانتیگراد	اتصال آغازگر (Annealing)
	۳۰ ثانیه	۲۷ درجه سانتیگراد	بسط (Extention)
مرحله سوم، یک چرخه	۱۰ دقیقه	۲۷ درجه سانتیگراد	بسط (Extention)

پس از اتمام واکنش، محصول PCR جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد آزمایش شد. به طوری که ۱۰ میکرولیتر از محصول را همراه با نشانگر اندازه DNA الکتروفورز گردید و سپس با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و با استفاده از اشعه UV، باندهای DNA بررسی شدند.

۲-۸- مرحله هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم های برشی

در این مرحله متناسب با شدت باند DNA در حجم مشخصی از محصول PCR (۱۰ میکرولیتر) که در این تحقیق، نسخه هایی از ژن rRNA ۱۸s بود را در یک تیوب ریخته و سپس به آن، ۲ میکرولیتر بافر آنزیم که توسط شرکت سازنده توصیه شده اند و همچنین ۰/۵ تا ۱ میکرولیتر از آنزیم های مختلف (۵-۲/۵ واحد) را اضافه کرده و سپس حجم آن با آب مقطر استریل به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از مخلوط کردن محلول فوق، نمونه ها برای تمام آنزیم ها بجز آنزیم Taq I (که در ۶۵ درجه سانتیگراد فعالیت می کند) را به مدت ۳-۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از گذشت زمان انکوباسیون محصول هضم

شده، واکنش هضم آنزیمی همراه با بافر الکتروفورز TBE (10 x) در کنار نشانگر 100 bp DNA ladder (Fermantas) بر روی ژل پلی اکریل آمید 10 درصد الکتروفورز شدند. مدت زمان الکتروفورز 2-2/5 ساعت و ولتاژ مورد استفاده 100-120 ولت بود. ضمناً برای مشاهده باندهای موردنظر زیر دستگاه UV را از روش رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید استفاده گردید.

۹-۲- چگونگی انتخاب آنزیم‌های برشی

هر آنزیم برشی، دارای جایگاه اختصاصی بوده که در موقعیت خاصی، مولکول DNA را قطع می‌کند. لذا باتوجه به تعداد بازهای آلی محصول PCR و جایگاه اختصاصی هر آنزیم و لیست آنزیم‌هایی که در توالی ژن 18S rRNA در ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) جایگاه اختصاصی دارند، مشخص گردید.

۱۰-۲- روش الکتروفورز عمودی (الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید)

۱-۱۰-۲ مواد موردنیاز

- آب مقطر
- پلی اکریل آمید
- بافر (10x) TBE
- آمونیوم پرسولفات 10 درصد (APS)
- بالن دارای بازوی جانبی برای تخلیه هوا
- بافر سنگین کننده
- بافر الکتروفورز (10x) TBE
- نشانگر 100 bp DNA ladder
- (N, N, N', N'- Tetramethylenedi amine) TEMED

- آکريل آميد (Acrylamid)
- بيس آکريل آميد (Bis acrylamid)
- آغازگراها

۲-۱۰-۲- روش تهيه ژل پلي اکريل آميد ۱۰ درصد

جهت تهيه ژل پلي آکريل آميد ۱۰ درصد، ابتدا ۱۱/۴۶ ميلي ليتر آب مقطر را با ۶/۷ ميلي ليتر مخلوط آکريل آميد و بيس آکريل آميد ۳۰ درصد و ۲ ميلي ليتر بافر TBE (۱۰ x) در داخل يك بالن داراي بازوي جانبي مخلوط نموده و سپس به مدت ۵ دقيقه توسط دستگاه كمپرسور هواگيري شد و بعد ۰/۱۵ ميكروليتر از محلول آمونيوم پرسولفات ۱۰ درصد و ۴ ميكروليتر از محلول TEMED به مخلوط قبلي اضافه گرديد. اين تركيب در فضاي بين دو شيشه كه از طرفين و قسمت زيري مسدود شده‌اند و از قسمت بالايي نيز شانه‌اي را در فضاي بين خود جا داده‌اند، ريخته شد. مدت زمان لازم براي بستن اين ژل در حدود ۳۰ دقيقه بوده كه بعد از اين مدت، شانه را از قسمت بالايي خارج کرده و بعد از شستشوي گودي‌هاي ايجاد شده توسط بافر الكتروليت TBE (۱۰x) نمونه‌هاي آماده شده در گودي‌هاي مربوطه ريخته شدند. مواد موردنياز جهت رنگ‌آميزي ژل پلي آکريل بشرح ذيل مي‌باشد:

- آب مقطر
- فرمالدئيد ۳۷ درصد
- اتانول مطلق
- اسيد استيك

۲-۱۰-۳- روش كار الكترولفورز عمودي

- ۱- ابتدا شیشه‌های مورد استفاده جهت تهیه ژل، فضا سازها (Spacer) و شانه (Comb) را با آب شستشو داده و بعد با الکل ۷۰٪ تمیز شدند تا هیچگونه لکه و پرزی بر روی آنها باقی نماند.
- ۲- فاصله دهنده‌ها را در سه ظرف شیشه زیرین گذاشته و شیشه رویی را بر روی آن قرارداده شد و سه ظرف شیشه‌ها با پنس بهم متصل گردید.
- ۳- به کمک آگار مذاب، فاصله بین شیشه‌ها بخوبی محکم شد تا ژل نشت نکند.
- ۴- محلول آکريل آميد ۱۰٪ تازه تهیه شده، به خوبی تکان داده شد تا گازهای اضافی آن خارج شده و مواد باهم مخلوط شدند. سپس مقدار ۱۵۰ میکرولیتر آمونیوم پر سولفات ۱۰ درصد و ۳ میکرولیتر محلول TEMED به آن اضافه گردید.
- ۵- محلول آکريل آميد تهیه شده را به آرامی بین شیشه‌ها ریخته و بعد شانه درون ژل قرار داده شد و حدود یک ساعت بی حرکت در روی میز قرار گرفت تا ژل بسته شود (تا چاهک‌هایی بعد از پلیمریزه شدن ژل درون جهت نمونه گذاری ایجاد شود).
- ۶- شانه و فضا ساز پائین را پس از بسته شدن ژل با دقت از شیشه و ژل جدا کرده و بعد شیشه حاوی ژل با گیره بطور محکم روی تانک وصل شد.
- ۷- از بافر (۱۰x) TBE با غلظت نهایی $1 \times$ را درون تانک عمودی ریخته و سپس با سرنگ، شستشوی چاهک‌های بالای ژل (جهت حذف ژل‌های اضافی) و گرفتن حباب‌های هوای پائین ژل (جهت اتصال صحیح جریان برق و حرکت مستقیم و صحیح نمونه‌ها) انجام شد.
- ۸- ژل به مدت یک ساعت با ولتاژ ۲۰۰ ولت پیش‌ران شد تا ذرات الکترواسمز و باردار ژل به دو قطب آند و کاتد رفته و از ژل خارج شوند.
- ۹- نمونه هضم آنزیمی با ۲ میکرولیتر بافر سنگین کننده مخلوط و در درون چاهک‌ها لود شد و در یکی از چاهک‌ها نیز، ۲ میکرولیتر سایز نشانگر، لود گردید.
- ۱۰- ژل به مدت چهار ساعت با ولتاژ ۱۵۰ ولت الکتروفورز شد. پس از اینکه رنگ نمونه‌ها به عنوان شاخص میزان حرکت باندها به پائین ژل رسید، الکتروفورز خاتمه می‌یابد.

فصل سوم

نتیجه گیری



۳-۱- نتایج :

استخراج DNA نمونه‌های ماهی مرکب (*S. pharaonis*) آب‌ها d خلیج فارس و دریای عمان با روش فنل - کلروفرم بخوبی انجام شد و قطعه DNA موردنظر با استفاده از آغازگرهای مزبور با تکنیک PCR تکثیر یافت. طول قطعه تکثیر شده ۵۰۲ جفت باز بود که این اندازه در تمام نمونه‌ها مشابه بوده است.

جهت انجام آنالیز RFLP از ۸ آنزیم بری:

۱ *Alu I* *Hae III* *Pvu II* *Hind III* *Dra I* *Rsa I* *Mnl I* *Taq I* استفاده گردید و الگوهای الکتروفورزی آنها روی ژل پلی‌آکریل آمید ده درصد با هم مقایسه شد. لازم به ذکر است که انتخاب آنزیم‌های برشی بکار رفته براساس توالی نوکلئوتیدی ژن rRNA ۱۸s که بیشترین تنوع را در برداشت و همچنین آنزیم‌هایی که قطعات قابل دیدن را ایجاد نماید صورت گرفت.

جدول شماره ۱: طول قطعات ایجاد شده بعد از هضم آنزیمی محصول PCR با هریک از آنزیم‌ها:

نام آنزیم	موقعیت جایگاه برش روی محصول PCR	طول قطعات بعد از برش با آنزیم (جفت باز)
<i>Alu I</i>	۴۶۵، ۲۲۳، ۱۸۶، ۵۷	۲۴۲، ۱۲۹، ۵۷، ۳۷، ۳۷
<i>Dra I</i>	۴۹۲، ۱۹۷	۲۹۵، ۱۹۷، ۱۰
<i>Hae III</i>	۳۱	۴۷۱، ۳۱
<i>Hind III</i>	۴۶۴	۴۶۴، ۳۸
<i>Mnl I</i>	۱۰۳، ۴۲۹	۳۲۶، ۱۰۳، ۷۳
<i>Pvu II</i>	۵۶	۴۴۶، ۵۶
<i>Rsa I</i>	۷۵	۴۲۷، ۷۵
<i>Taq I</i>	۴۸۶، ۴۳۱	۴۳۱، ۵۵، ۱۶

آنزیم *Alu I* دارای ۴ جایگاه شناسایی (AG↓CT) روی محصول PCR می‌باشد که بعد از تأثیر تعداد ۵ قطعه با اندازه‌های ۳۷، ۳۷، ۵۷، ۱۲۹ و ۲۴۲ جفت باز ایجاد می‌کند.



آنزیم *Dra I* دارای ۲ جایگاه شناسایی (TTT↓AAA) روی محصول PCR می باشد که بعداز تأثیر ۳ قطعه با اندازه های ۲۹۵، ۱۹۷ و ۱۰ جفت باز ایجاد می کند.

آنزیم *Hae III* دارای یک جایگاه شناسایی (GG↓CC) روی محصول PCR می باشد که بعداز تأثیر ۲ قطعه با اندازه های ۳۱ و ۴۷۱ جفت باز ایجاد می کند.

آنزیم *Hind III* دارای یک جایگاه شناسایی (AAG↓CTT) روی محصول PCR می باشد که بعداز تأثیر ۲ قطعه با اندازه های ۳۸ و ۴۶۴ جفت باز ایجاد می کند.

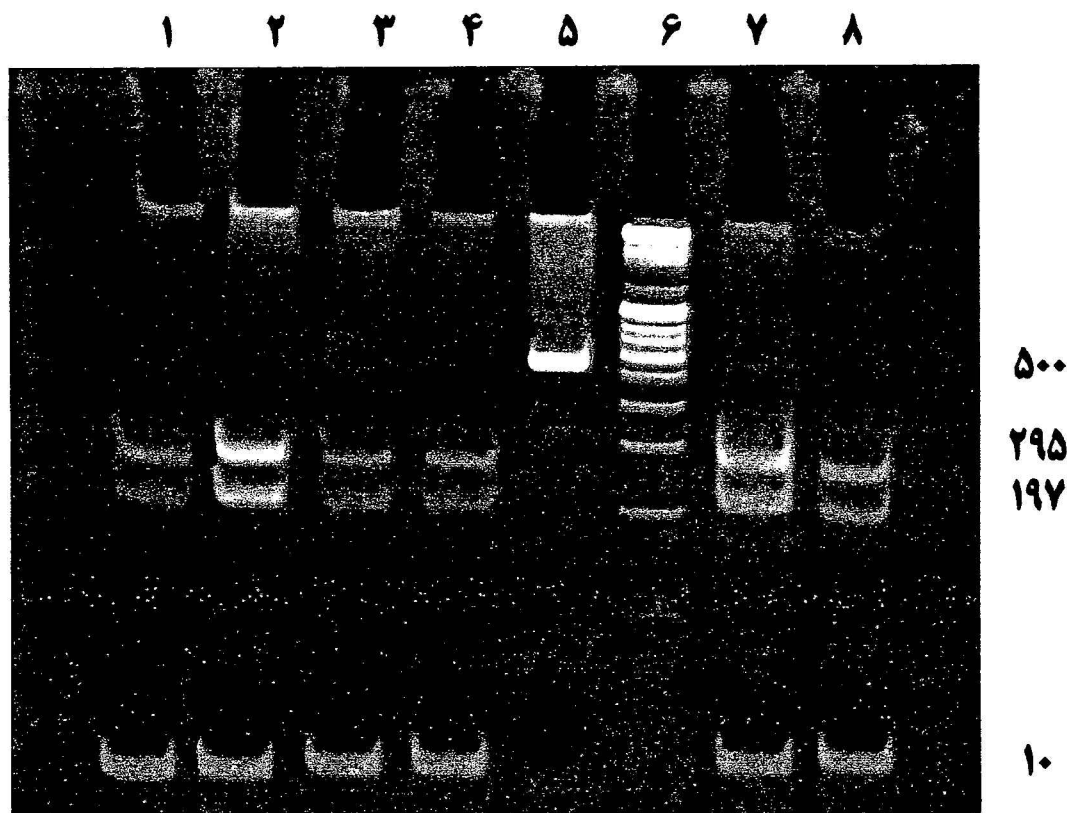
آنزیم *Mnl I* دارای ۲ جایگاه شناسایی روی محصول PCR می باشد که بعداز تأثیر ۳ قطعه با اندازه های ۷۳، ۱۰۳ و ۳۲۶ جفت باز ایجاد می کند.

آنزیم *Pvu II* دارای یک جایگاه شناسایی (CAG↓CTG) روی محصول PCR می باشد که بعداز تأثیر ۲ قطعه با اندازه های ۵۶ و ۴۴۶ جفت باز ایجاد می کند.

آنزیم *Rsa I* دارای یک جایگاه شناسایی (GT↓AC) روی محصول PCR می باشد که بعداز تأثیر ۲ قطعه با اندازه های ۷۵ و ۴۲۷ جفت باز ایجاد می کند.

آنزیم *Taq I* دارای ۲ جایگاه شناسایی (T↓CGA) روی محصول PCR می باشد که بعداز تأثیر ۳ قطعه با اندازه های ۱۶، ۵۵ و ۴۳۱ جفت باز ایجاد می کند (در صفحات بعد الگوهای هضم آنزیمی با استفاده از ۸

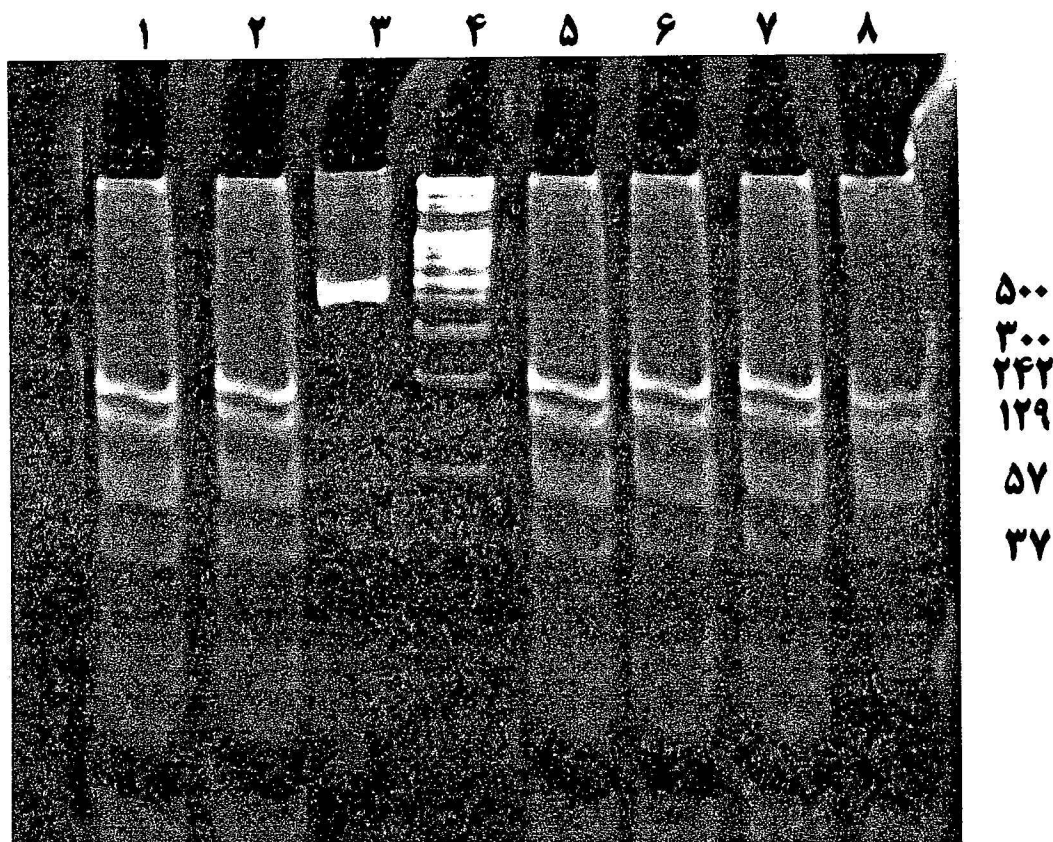
آنزیم مزبور با شماره های ۸ تا ۱ و همچنین توالی های نوکلئو تیدی مورد استفاده ارائه شده است).



شکل شماره ۱: الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با استفاده از آنزیم ۱ *Dra* بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪

ستون ۱: نمونه منطقه خوزستان ، ستون ۲: نمونه منطقه بوشهر ستون‌های ۳ و ۴: نمونه‌های منطقه هرمزگان، ستون ۵: محصول PCR، ستون ۶: مارکر ۱۰۰ bp ، ستون‌های ۷ و ۸: نمونه‌های منطقه سیستان و بلوچستان

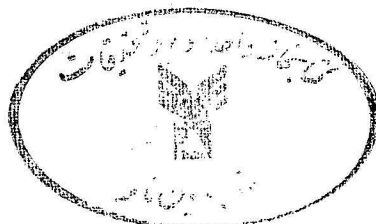


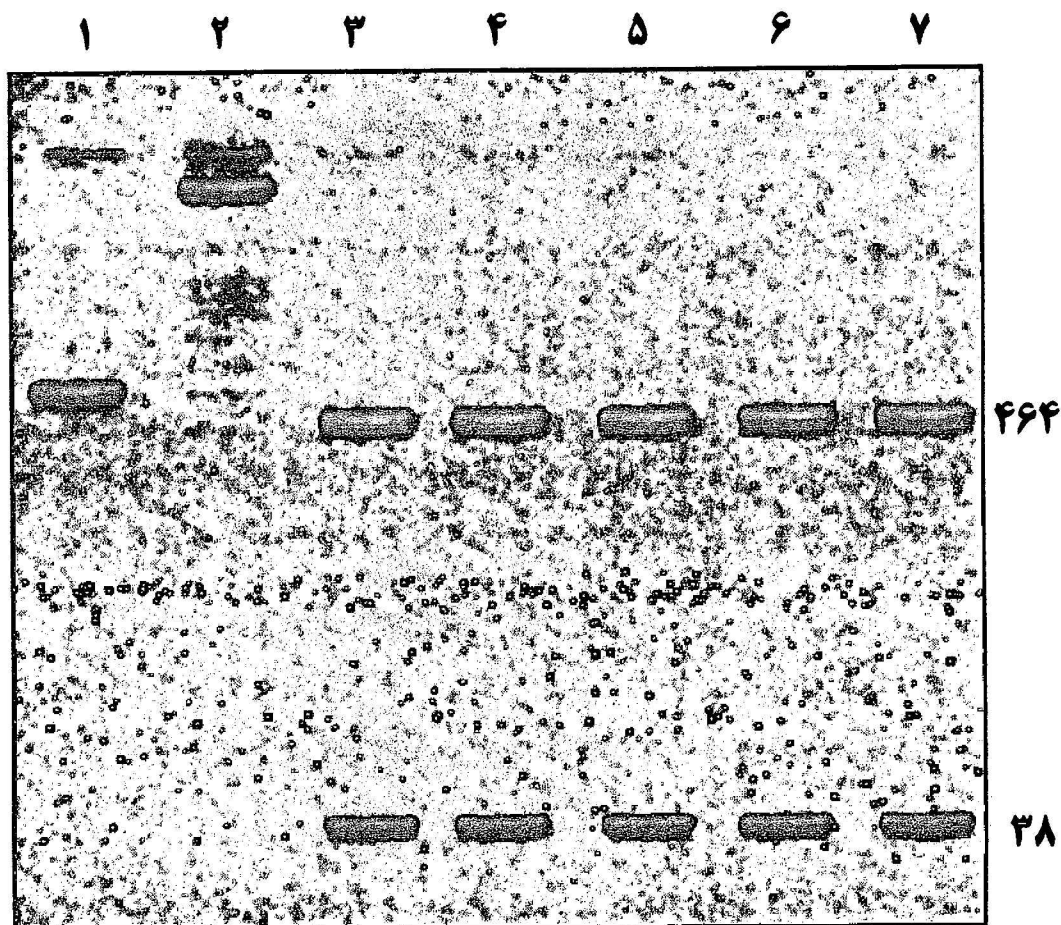


شکل شماره ۲: الگوهای هضم آنزیمی برمحصول PCR با استفاده از آنزیم *Alu I* بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪

ستون ۱: نمونه منطقه خوزستان ، ستون ۲: محصول PCR

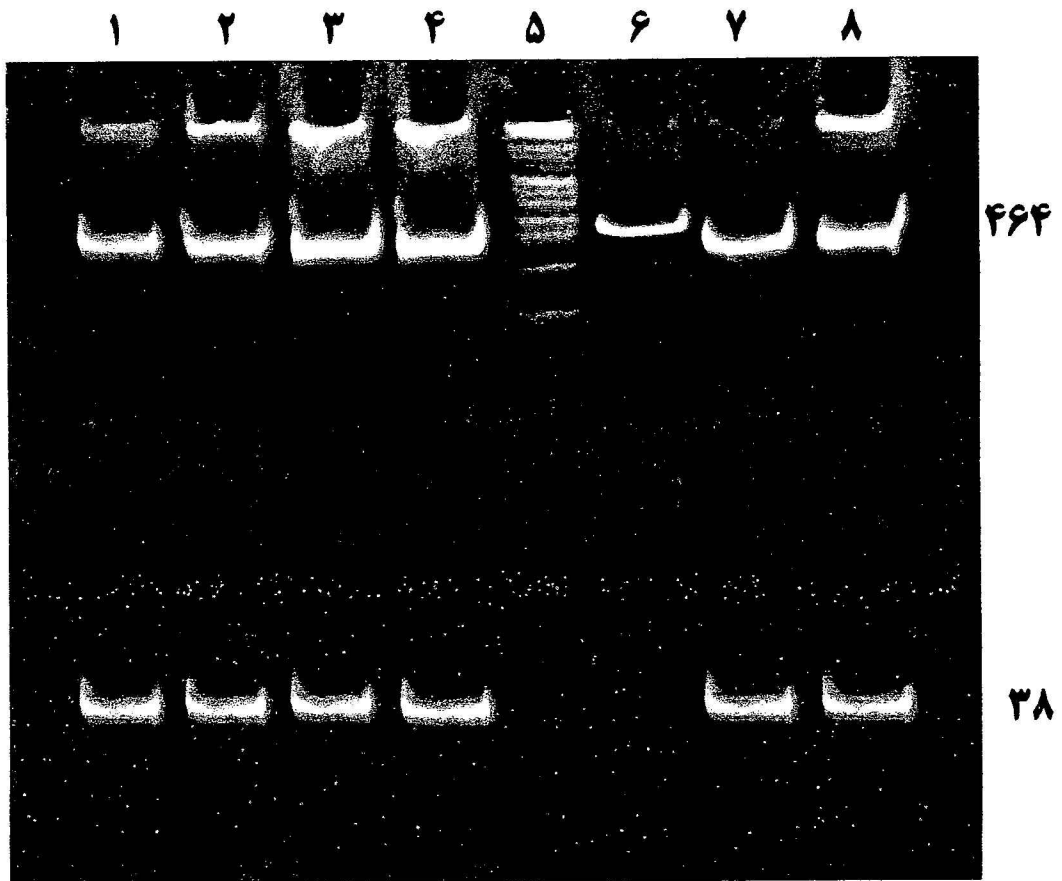
ستون ۳: مارکر ۱۰۰ bp ، ستون ۴: نمونه منطقه بوشهر، ستون ۵: نمونه منطقه هرمزگان، ستون ۶: نمونه منطقه سیستان و بلوچستان.





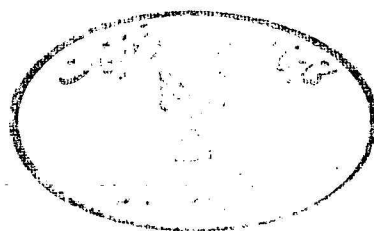
شکل شماره ۲: الگوی هضم آنزیمی بر محصول PCR با استفاده از آنزیم *Hind III* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد.

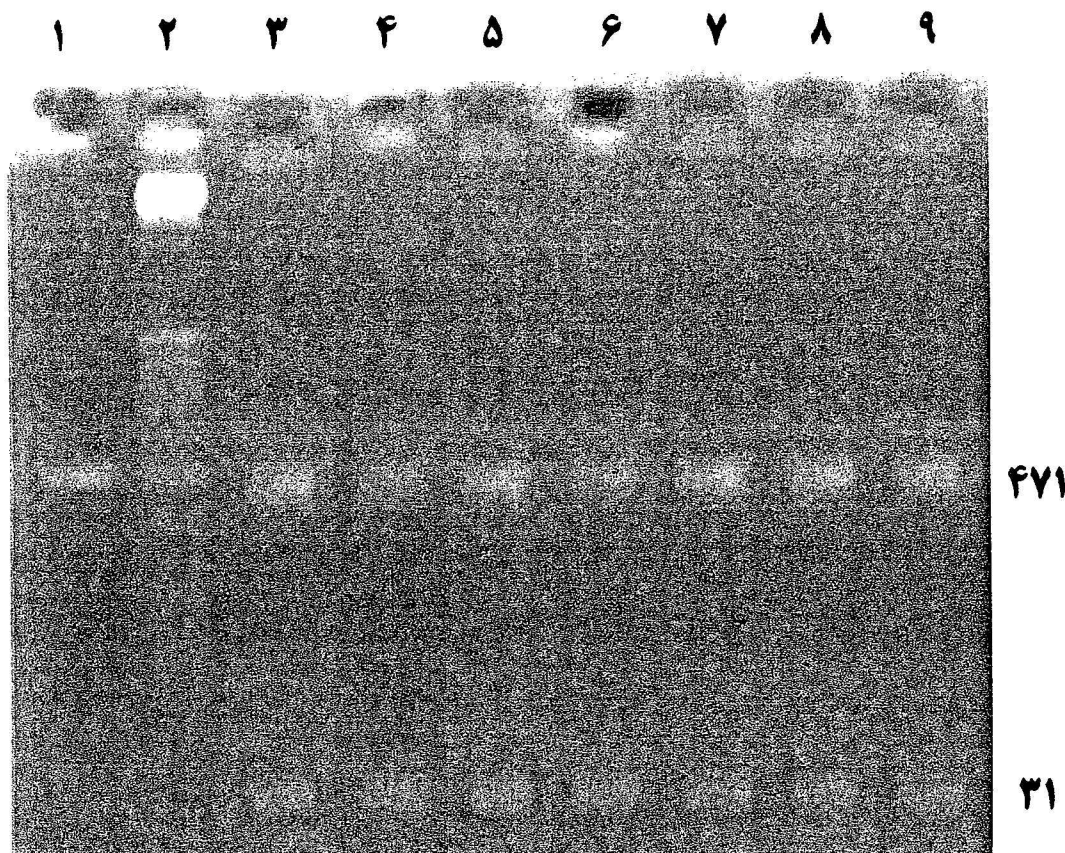
ستون ۱: محصول PCR، ستون ۲: مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۳: نمونه منطقه خوزستان، ستون ۴: نمونه منطقه بوشهر، ستون ۵: نمونه منطقه هرمزگان، ستون ۶: نمونه منطقه سیستان و بلوچستان



شکل شماره ۴: الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با استفاده از آنزیم *Hind III* بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪

ستون ۱: نمونه منطقه خوزستان، ستون ۲، ۳: نمونه منطقه بوشهر، ستون ۴: نمونه منطقه هرمزگان، ستون ۵: مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۶: محصول PCR، ستونهای ۷ و ۸: نمونه‌های منطقه سیستان و بلوچستان

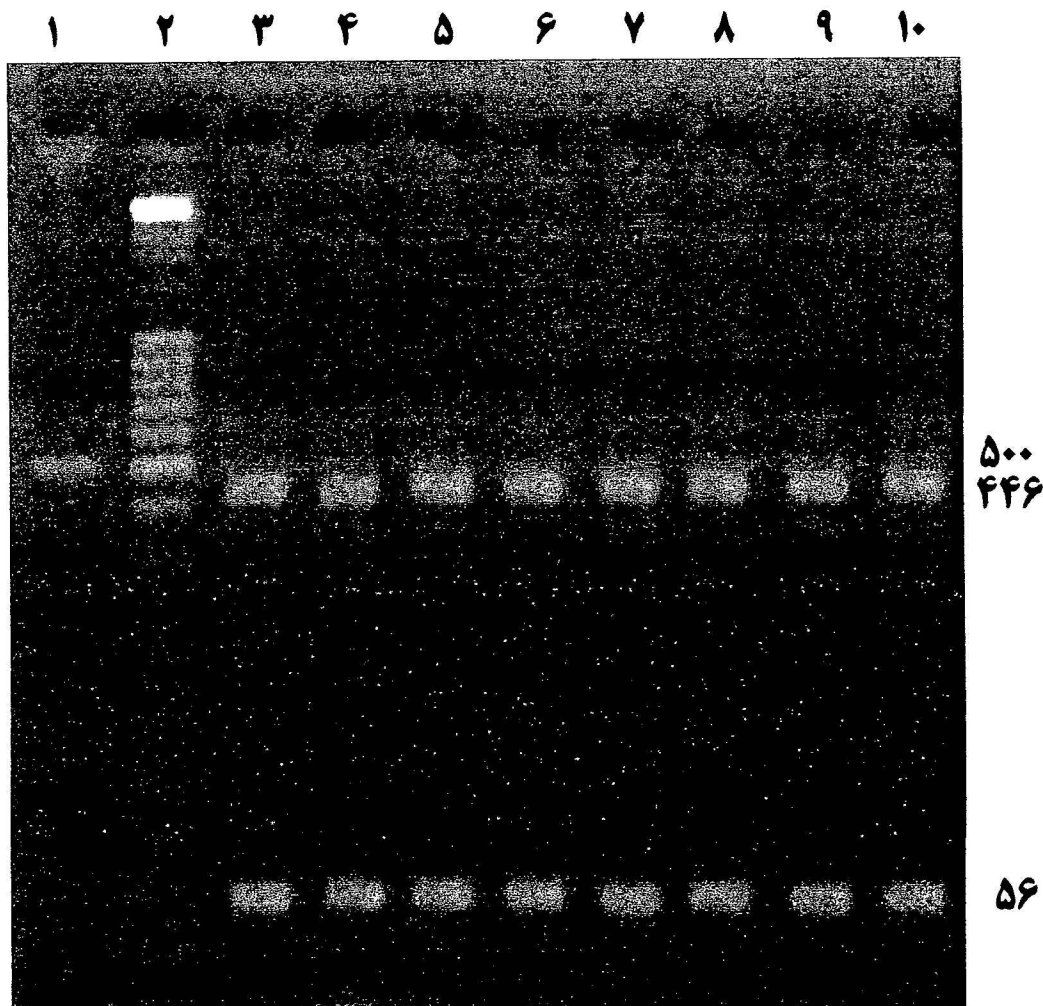




شکل شماره ۵: الگوی هضم آنزیمی برمحصول PCR با استفاده از آنزیم *Hae III* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد.

ستون ۱: محصول PCR، ستون ۲: مارکر bp ۱۰۰، ستون ۳: نمونه منطقه خوزستان، ستون ۴، ۵: نمونه منطقه بوشهر، ستونهای ۶ و ۷: نمونههای منطقه هرمزگان، ستونهای ۸ و ۹: نمونههای منطقه سیستان و بلوچستان.

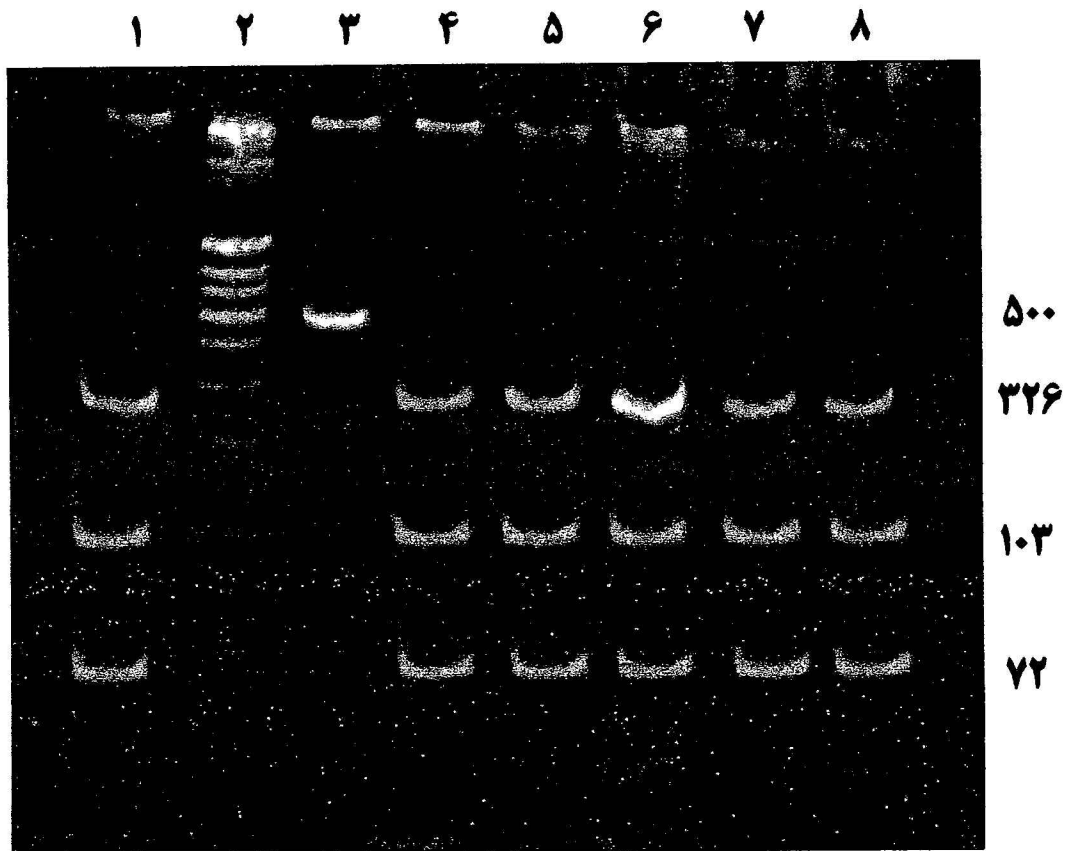




شکل شماره ۶: الگو هضم آنزیمی بر محصول PCR با استفاده از آنزیم *PvuII* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪

ستون ۱: محصول PCR، ستون ۲: مارکر ۱۰۰ bp، ستونهای ۳ و ۴: نمونه‌های منطقه خوزستان، ستونهای ۵ و ۶: نمونه‌های منطقه بوشهر، ستونهای ۷ و ۸: ستونهای منطقه هرمزگان، ستونهای ۹ و ۱۰: نمونه‌های منطقه سیستان و بلوچستان



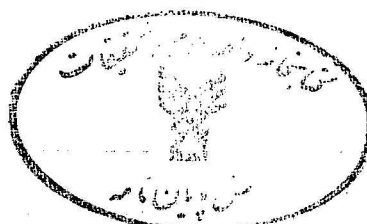


شکل شماره ۷: الگوی هضم آنزیمی بر محصول PCR با *Mnl I* بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪
 ستون ۱: نمونه منطقه خوزستان، ستون ۲: مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۳: محصول PCR،
 ستون ۴: نمونه منطقه خوزستان، ستونهای ۵ و ۶: نمونه‌های منطقه هرمزگان، ستون ۷:
 نمونه منطقه سیستان و بلوچستان





شکل شماره ۸: الگوی هضم بر محصول PCR آنزیمی با استفاده از آنزیمهای *Alu I*-*Taq I*-*Rsa I*-*Mnl I* بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪
 ستونهای ۱ و ۲: الگوی هضم با آنزیمهای *Alu I* ستون ۳: آنزیم *Taq I* ستون ۴: مارکر
 ۱۰۰ bp ستون ۵: محصول PCR ستون ۶: آنزیم *Rsa I* ستونهای ۷ و ۸: الگوی هضم با
 آنزیم *Mnl I*



توالی نوکلئوتیدی مورد استفاده از زن 18s rRNA در طراحی آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب:

```

1 gtctctctgt atttattaaa tagagagttg ggcctgctca gtgatataaa tttacagct
61 gcggtatattt aactgtacta aggtagcata ataatttgcc ttataaattg aggctagaat
121 gaatggtttg acgaagggtt atctgtctct attttattta atagaagtta attttttagt
181 gaaaaagcta aaatatttta aagggacgag aagaccctat tgagcttaaa tttataataa
241 ttgtgtttac agtatttttag taaattttta ttgggggtgat taaggaataa aaatatatta
301 aataataact tccttaattg tgtaatactg ttaggttaag taaccaataa tattgcttat
361 aataaagtta ccatagggat aacagcgtaa tttattttaga gagttcttat tgaaaaataa
421 gattgcgacc tcgatgttgg attaaagtaa ccttaagggtg cagaagcttt atatggttaa
481 tctgttcgat ttttaaaact tt

```

آنزیم *Alu I* (دارای ۴ جایگاه شناسایی AG↓CT می باشد)

```

1 gtctctctgt atttattaaa tagagagttg ggcctgctca gtgatataaa tttacagct
61 gcggtatattt aactgtacta aggtagcata ataatttgcc ttataaattg aggctagaat
121 gaatggtttg acgaagggtt atctgtctct attttattta atagaagtta attttttagt
181 gaaaaagcta aaatatttta aagggacgag aagaccctat tgagcttaaa tttataataa
241 ttgtgtttac agtatttttag taaattttta ttgggggtgat taaggaataa aaatatatta
301 aataataact tccttaattg tgtaatactg ttaggttaag taaccaataa tattgcttat
361 aataaagtta ccatagggat aacagcgtaa tttattttaga gagttcttat tgaaaaataa
421 gattgcgacc tcgatgttgg attaaagtaa ccttaagggtg cagaagcttt atatggttaa
481 tctgttcgat ttttaaaact tt

```

آنزیم *Dra I* (دارای ۲ جایگاه شناسایی TTT↓AAA می باشد)

```

1 gtctctctgt atttattaaa tagagagttg ggcctgctca gtgatataaa tttacagct
61 gcggtatattt aactgtacta aggtagcata ataatttgcc ttataaattg aggctagaat
121 gaatggtttg acgaagggtt atctgtctct attttattta atagaagtta attttttagt
181 gaaaaagcta aaatatttta aagggacgag aagaccctat tgagcttaaa tttataataa
241 ttgtgtttac agtatttttag taaattttta ttgggggtgat taaggaataa aaatatatta
301 aataataact tccttaattg tgtaatactg ttaggttaag taaccaataa tattgcttat
361 aataaagtta ccatagggat aacagcgtaa tttattttaga gagttcttat tgaaaaataa
421 gattgcgacc tcgatgttgg attaaagtaa ccttaagggtg cagaagcttt atatggttaa
481 tctgttcgat ttttaaaact tt

```

↓
 آنزیم Hae III (دارای ۱ جایگاه شناسایی CC↓GG می باشد)

```

1  gtctctctgt atttattaaa tagagagttg ggcttgctca gtgatataaa tttaacagct
61  gcggtatfff aactgtacta aggtagcata ataatttgcc ttataaattg aggctagaat
121 gaatggtttg acgaagggtt atctgtctct attttattta atagaagtta attttttagt
181 gaaaaagcta aaatatttta aagggacgag aagaccctat tgagcttaaa tttataataa
241 ttgtgtttac agtatttttag taaattttta ttgggggtgat taaggaataa aaatatatta
301 aataataact tccttaattg tgtaatactg ttaggttaag taaccaataa tattgcttat
361 aataaagtta ccatagggat aacagcgtaa tttattttaga gagttcttat tgaaaaataa
421 gattgcgacc tcgatgttgg attaaagtaa ccttaagggtg cagaagcttt atatggtaaa
481 tctgttcgat ttttaaaact tt
  
```

↓
 آنزیم Taq I (دارای ۲ جایگاه شناسایی T↓CGA می باشد)

```

1  gtctctctgt atttattaaa tagagagttg ggcttgctca gtgatataaa tttaacagct
61  gcggtatfff aactgtacta aggtagcata ataatttgcc ttataaattg aggctagaat
121 gaatggtttg acgaagggtt atctgtctct attttattta atagaagtta attttttagt
181 gaaaaagcta aaatatttta aagggacgag aagaccctat tgagcttaaa tttataataa
241 ttgtgtttac agtatttttag taaattttta ttgggggtgat taaggaataa aaatatatta
301 aataataact tccttaattg tgtaatactg ttaggttaag taaccaataa tattgcttat
361 aataaagtta ccatagggat aacagcgtaa tttattttaga gagttcttat tgaaaaataa
421 gattgcgacc tcgatgttgg attaaagtaa ccttaagggtg cagaagcttt atatggtaaa
481 tctgttcgat ttttaaaact tt
  
```

↓
 آنزیم Hind III (دارای ۱ جایگاه شناسایی AAG↓CTT می باشد)

```

1  gtctctctgt atttattaaa tagagagttg ggcttgctca gtgatataaa tttaacagct
61  gcggtatfff aactgtacta aggtagcata ataatttgcc ttataaattg aggctagaat
121 gaatggtttg acgaagggtt atctgtctct attttattta atagaagtta attttttagt
181 gaaaaagcta aaatatttta aagggacgag aagaccctat tgagcttaaa tttataataa
241 ttgtgtttac agtatttttag taaattttta ttgggggtgat taaggaataa aaatatatta
301 aataataact tccttaattg tgtaatactg ttaggttaag taaccaataa tattgcttat
361 aataaagtta ccatagggat aacagcgtaa tttattttaga gagttcttat tgaaaaataa
421 gattgcgacc tcgatgttgg attaaagtaa ccttaagggtg cagaagcttt atatggtaaa
481 tctgttcgat ttttaaaact tt
  
```

آنزیم *MnI I* (دارای ۲ جایگاه شناسایی) $\left. \begin{array}{l} CCTCN_7 \downarrow 3' \\ GGAGN_6 \downarrow 5' \end{array} \right\}$ می باشد

```

1 gtctctctgt atttattaaa tagagagttg ggcctgctca gtgatataaa ttttaacagct
61 gcggtatttt aactgtacta aggtagcata ataatttgcc ttataaattg aggctagaat
121 gaatggtttg acgaagggtt atctgtctct attttattta atagaagtta attttttagt
181 gaaaaagcta aaatatttta aagggacgag aagaccctat tgagcttaaa ttttaataata
241 ttgtgtttac agtatttttag taaattttta ttgggggtgat taaggaataa aaatatatta
301 aataataact tccttaattg tgtaatactg ttaggttaag taaccaataa tattgcttat
361 aataaagtta ccatagggat aacagcgtaa tttattttaga gagttcttat tgaaaaataa
421 gattgcgacc tcgatgttgg attaaagtaa ccttaagggtg cagaagcttt atatggtaaa
481 tctgttcgat ttttaaaaact tt

```

آنزیم *Pvu II* (دارای یک جایگاه شناسایی) $\downarrow CAG \rightarrow CTG$ می باشد

```

1 gtctctctgt atttattaaa tagagagttg ggcctgctca gtgatataaa ttttaacagct
61 gcggtatttt aactgtacta aggtagcata ataatttgcc ttataaattg aggctagaat
121 gaatggtttg acgaagggtt atctgtctct attttattta atagaagtta attttttagt
181 gaaaaagcta aaatatttta aagggacgag aagaccctat tgagcttaaa ttttaataata
241 ttgtgtttac agtatttttag taaattttta ttgggggtgat taaggaataa aaatatatta
301 aataataact tccttaattg tgtaatactg ttaggttaag taaccaataa tattgcttat
361 aataaagtta ccatagggat aacagcgtaa tttattttaga gagttcttat tgaaaaataa
421 gattgcgacc tcgatgttgg attaaagtaa ccttaagggtg cagaagcttt atatggtaaa
481 tctgttcgat ttttaaaaact tt

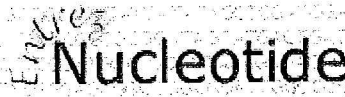
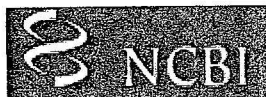
```

آنزیم *Rsa I* (دارای یک جایگاه شناسایی) $\downarrow GT \rightarrow AC$ می باشد

```

1 gtctctctgt atttattaaa tagagagttg ggcctgctca gtgatataaa ttttaacagct
61 gcggtatttt aactgtacta aggtagcata ataatttgcc ttataaattg aggctagaat
121 gaatggtttg acgaagggtt atctgtctct attttattta atagaagtta attttttagt
181 gaaaaagcta aaatatttta aagggacgag aagaccctat tgagcttaaa ttttaataata
241 ttgtgtttac agtatttttag taaattttta ttgggggtgat taaggaataa aaatatatta
301 aataataact tccttaattg tgtaatactg ttaggttaag taaccaataa tattgcttat
361 aataaagtta ccatagggat aacagcgtaa tttattttaga gagttcttat tgaaaaataa
421 gattgcgacc tcgatgttgg attaaagtaa ccttaagggtg cagaagcttt atatggtaaa
481 tctgttcgat ttttaaaaact tt

```



PubMed

Nucleotide

Protein

Genome

Structure

PMC

Taxonomy

OMIM

Books

Search Nucleotide

for

Go Clear

Limits

Preview/Index

History

Clipboard

Details

Display

GenBank

Send

all to file

Range: from begin

to end

☐ Reverse complemented strandFeatures: ☐ SNP☐ CDD ☒ MGC ☐ HPRD ☐ STS☐ 1: AF369117. Reports *Sepia pharaonis* 1...[gi:14161386]

Links

LOCUS AF369117 502 bp DNA linear INV 21-MAY-2001

DEFINITION *Sepia pharaonis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product.

ACCESSION AF369117

VERSION AF369117.1 GI:14161386

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion *Sepia pharaonis*ORGANISM *Sepia pharaonis*Eukaryota; Metazoa; Mollusca; Cephalopoda; Coleoidea; Neocoleoidea; Decapodiformes; Sepioidea; Sepiidae; *Sepia*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 502)

AUTHORS Zheng,X.D., Wang,R.C., Xiao,S. and Chen,B.

TITLE Phylogenetic relationships of the cuttlefishes (Mollusca: Cephalopoda) based on 16S rRNA sequences

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 502)

AUTHORS Zheng,X.D., Wang,R.C., Xiao,S. and Chen,B.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (09-APR-2001) Fisheries College, Ocean University of Qingdao, 5 YuShan Road, Qingdao, Shandong 266003, P.R.China

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..502

/organism="Sepia pharaonis"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/db_xref="taxon:158019"

/tissue_type="mantle"

rRNA

<1..>502

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

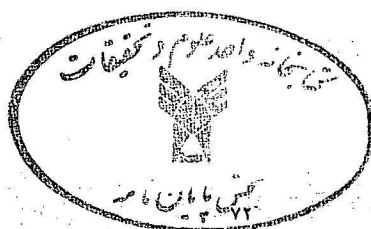
1  gtctctctgt atttattaaa tagagagttg ggcctgctca gtgatataaa tttaacagct
61  gcggtatfff aactgtacta aggtagcata ataatttgcc ttataaattg aggctagaat
121  gaatggtttg acgaaggttt atctgtctct atttatttta atagaagtta attttttagt
181  gaaaaagcta aaatatftha aagggacgag aagaccctat tgagcttaaa tttaataata
241  ttgtgtttac agtatfthtag taaattfthaa ttgggggtgat taagggaataa aaatatatta
301  aataataact tccttaattg tgtaatactg ttaggttaag taaccaataa tattgcttat
361  aataaaagta ccatagggat aacagcgtaa tttattfthaga gagttcttat tgaaaaataa
421  gattgcgacc tcgatgttgg attaaagtaa ccttaagggtg cagaagcttt atatggtaaa
481  tctgttcgat ttttaaaaact tt

```

//

فصل چہارم

بحث



دانستن ساختار ژنتیکی آبزیان کمک مهمی در بررسی تنوع ژنتیکی آنها می‌نماید. یکی از راههای بررسی ساختار ژنتیکی آبزیان، استفاده از ژنتیک جمعیتها بوده و شناسایی تحولات درون گونه‌ای و ساختار جمعیت یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره‌برداری می‌باشد. امروزه هدف اصلی آزمایشات ژنتیک ملکولی در آبزیان، آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه‌ای سیستماتیک و طبقه‌بندی آنها می‌باشد (lu, ۱۹۹۸).

در زمینه ژنتیک مولکولی و تکنیک‌های مربوط به آن می‌توان به RAPD_s و RFLP_s و Allozyme و AFLP_s اشاره نمود که به وسیله آنها می‌توان در صورت عدم ثبت مشاهدات مورفولوژیک بین گونه‌ها به عنوان شاخص تفکیکی بین جمعیتها و روابط ژنتیکی موجود بین گونه‌ها بکار برد. لازم به ذکر است که عدم مشاهده تنوع یا تنوع در سطح پایین در mt DNA با استفاده از آنالیز RFLP و آلوزیم‌ها در بعضی ماهیان گزارش شده است (Badaracco et al., ۱۹۹۸).

گوناگونی ژنتیکی به عنوان صفات ماندگار یک گونه با مرگ جاندار ناپدید نمی‌شود بلکه به نسل‌های بعد منتقل می‌گردد و به عنوان عوامل پایدار و اسناد محکمی در مطالعات رده‌بندی محسوب می‌شوند (Gray, ۱۹۹۷).

در بررسی انجام گرفته در خصوص تفاوت‌های ژنتیکی در (*Sepia pharaonis*) و (*Sepia officinalis*) ساختار ژنتیکی انواع سرپایان (Cephalopods) با کاربرد آنالیزهای RFLP و تعیین توالی بازهای DNA (DNA sequencing) مورد مطالعه قرار گرفت. در این تحقیق گونه‌های ماهی مرکب ببری و سپیا اوفی سینالیس و اسکالوپ‌های اوپریمنا (*Euprymna scolopes*) که گونه‌های متفاوتی هستند بررسی شدند و معلوم گردید که بسیاری از تنوع ژنتیکی گونه‌ها با استفاده از این دو تکنیک مولکولی کشف خواهد شد.

از معمول‌ترین روش‌ها در اکثر آزمایشات مولکولی در جهت دستیابی به DNA با وزن مولکولی و کیفیت بالا در مطالعات ژنتیک جمعیت، استفاده از روش فنل - کلروفرم می‌باشد (Hillis and Moritz, ۱۹۹۰).

استخراج DNA با روش فنل - کلروفرم به دلیل مزیت جداکنندگی فنل و کلروفرم در مقابل پروتئین، یکی از روشهایی است که در آن نسبت به بقیه روشها احتمال استخراج DNA خالص بیشتر وجود دارد ولی در روش جوشاندن به دلیل پس از لیز شدن بافت توسط گرما و هیدروکسید پتاسیم مواد زاید از عصاره حاصل شده جدانمی‌گردد و در صورت استفاده مستقیم برای آزمایشات PCR، نتایج مطلوبی پس از الکتروفورز بر روی ژل مشاهده نمی‌شود و باندها به صورت ضعیف ظاهر شده و تشخیص موقعیت باندها نسبت به یکدیگر مشکل می‌باشد.

قابل ذکر است که پلی مورفیسم ژنوم میتوکندریایی و هسته‌ای به عنوان شاخص ژنتیکی ارزشمند در ارزیابی ژنوم و ساختار جمعیتی می‌باشد (Taggart and Hynes., ۱۹۹۸) و از آنجائیکه آنزیم‌ها فرآورده‌های ژنها بوده و نشان دادن تغییرات الکتروفورزی در آنها بر روی ژل انعکاس مستقیمی از اختلاف ژنتیکی آنها است برای بررسی تغییرات ژنوم میتوکندری، از مکان‌های عمل آنزیم‌های برشی استفاده می‌شود. محل یک آنزیم اختصاصی بر روی ژل الکتروفورز شده به صورت یک باند یا باندهای رنگ‌آمیزی شده غیرمحلول آشکار می‌شود و مسافتی که آن آنزیم‌ها بر اثر جریان الکتریکی از قطب منفی به قطب مثبت بر روی ژل پیموده‌اند بیانگر اندازه و شکل مولکولی آنها است که این روش در حقیقت یک ارزیابی غیرمستقیم از تنوع DNA می‌باشد (Piertney et al., ۲۰۰۳).

آنالیز mt DNA به وسیله روش مستقیم توالی نوکلوتیدها و روش غیرمستقیم با آنالیز RFLP صورت می‌پذیرد که روش پیشرفته‌ای برای جمعیتها می‌باشد بطوریکه نشانگر RFLP بعنوان یکی از مارکرهای متداول ژنتیکی به طور وسیعی در آبزیان به منظور رده‌بندی، تعیین تنوع ژنتیکی، تعیین ساختار ژنتیکی جمعیتها بکار برده می‌شود (Nicholas et al., ۱۹۹۷).

Ovenden و همکاران در سال ۱۹۹۷ مطرح نمودند که بطورکلی احتمالاً در ارگانیزم‌های دریایی، تنوع mt DNA خیلی کم است و عواملی چون شرایط نامناسب و محدود و یا مرگ و میرهای فامیلی که به دلایل ویژه‌ای اتفاق می‌افتد از علل بروز اختلالات نوکلئوتیدی است. اغلب گزارشات مربوط به آنالیز mt DNA

ماهیان، تنوع هاپلوتیپی کمی را نشان می دهد و در اقع تعداد هاپلوتیپ هایی که وجود دارد، مشتقات جهش یافته هستند.

بررسی RFLP ژن ریپوزومال RNA به عنوان نشانگر مولکولی می تواند در مورد گونه های مختلف سرپایان مورد استفاده قرار گیرد. البته باید در نظر داشت که در این زمینه ابهامات فراوانی وجود دارد، زیرا این جانوران دلیل فقدان پوسته با ضمامم آهکی به ندرت به صورت فسیل در می آیند در نتیجه اطلاعات چندانی راجع به گذشته این آبزیان در دست نمی باشد. همچنین با بررسی تعداد گونه های بیشتر سرپایان می توان به بررسی حالت های مونوفیلی و پلی فیلی در این گروه از جانوران که همواره مورد بحث بوده است پرداخت (Carlini et al., ۱۹۹۹) و (Clark, ۱۹۹۸) و (Lee, ۱۹۸۳).

در سال ۱۳۷۸ آقای دکتر ولی نسب در رساله دکتری خویش تحت عنوان: بررسی تنوع جمعیتی ماهی مرکب بیری (*Sepia pharaonis*) در آب های خلیج فارس و دریای عمان با انجام مطالعات زیست شناسی، ریخت شناسی و بیوشیمیایی، وضعیت جمعیتی این گونه در آب های خلیج فارس و دریای عمان مورد مطالعه قرار داد. در این مطالعه علاوه بر ثبت داده های زیست شناختی، اقدام به اندازه گیری و شمارش ۲۱ متغیر کمی و کیفی گردید و در ادامه با استفاده از نرم افزار های SPSS، Harvard، Statistica و Statgraph تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات صورت گرفت. همچنین با برش گیری از بافتهای عضله، چشم و کبد و نگهداری آنها در ازلت مایع و انتقال به آزمایشگاههای تحقیقاتی، عملیات الکتروفورز به روش ژل پلی آکریل آمید به مورد اجرا در آمد. در ضمن با توجه به داده های فراوانی طولی و وزنی بر حسب منطقه و جنسیت و نیز مقایسه کمی کلیه متغیر ها مشخص گردید که نرها همواره از ماده ها و نیز نمونه های منطقه دریای عمان از نمونه های منطقه خلیج فارس بزرگتر بوده اند. میزان همبستگی میان متغیر های کمی محاسبه گردید که بین اغلب متغیر ها همبستگی معنی دار وجود داشته است. با انجام آزمایشات الکتروفورز پروتئینی بافتهای مورد مطالعه مشخص گردید که دو بافت عضله و چشم اختلافات اساسی را در تعداد باندهای شاخص نشان می دهند. بافت کبد، بافت مناسبی برای مطالعه جمعیت ماهی مرکب تشخیص داده نشد. لذا با استناد به تمام اطلاعات موجود شامل اختلاف در زمان تخم ریزی، مشاهدات حاصل از دندوگرامها، وجود اختلاف معنی دار در آنالیز واریانس یکطرفه، اختلاف در اندازه و وزن، وجود تفاوت های اکولوژیک بین آب های

خلیج فارس و دریای عمان و نیز الکتروفورز پروتئینها چنین نتیجه گیری شده است که احتمال حضور دو جمعیت جداگانه در دو منطقه بوشهر و بلوچستان وجود داشته که نیاز به بررسیهای دقیق مولکولی می باشد. در سال ۱۳۸۲ آقای مهندس فرامرز لالویی به بررسی مولکولی جمعیت ماهی *Barbus capito* در آبهای حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP پرداخت. در این بررسی ۶۰ عدد ماهی از گونه *Barbus capito* از دریا و رودخانه های استان مازندران و گیلان جمع آوری گردید. DNA با روش فنل-کلروفرم از بافت باله این ماهی استخراج شد. براساس توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم b این ماهی یک جفت پرایمر طراحی گردید و PCR با ۶۰ نمونه ماهی و با برنامه مناسب انجام شد که در نتیجه آن محصول PCR، ۱۰۶۲ bp از نمونه ها بدست آمد. جهت انجام RFLP از آنزیمهای *Hinc II*، *Dde I*، *Hinf I*، *Alu I*، *Taq I*، *Hae III*، *Sau3AI*، *Rsa I*، *Ava I*، *Hpa II* برای هضم محصول PCR استفاده شد. الگوهای هضم آنزیمی با ژل پلی آکریل آمید و رنگ آمیزی نیترات نقره مشاهده گردید. این الگوها برای تمام نمونه ها مشابه بود. لذا پدیده پلی مورفیسم با استفاده از آنزیمهای فوق و ژن سیتوکروم b در این ماهی قابل مشاهده نبوده و جمعیتی قابل جداسازی تشخیص داده نشد و تمام افراد از ژنوتیپ هموزن برخوردار بودند.

در سال ۱۳۷۹ آقای دکتر سیدعلی سیدعلی بابایی به بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز I به روش RFLP پرداخت. این تحقیق به منظور شناسایی جمعیتهای میگوی *P. semisulcatus* و همچنین معرفی مارکر مولکولی جهت شناسایی گونه های *P. indicus*، *P. merguensis*، *P. semisulcatus* در خلیج فارس و دریای عمان صورت گرفت. نمونه گیری به روش ترال کف از دو منطقه هرمز و بوشهر واقع در خلیج فارس و دریای عمان انجام شد. استخراج DNA با استفاده از دو روش فنل-کلروفرم و بدون آن انجام و جهت مطالعه تفاوتهای جمعیتی میگوی ببری سبز از آنالیز نتایج حاصل از RFLP ژن سیتوکروم اکسیداز I واقع بر روی ژنوم میتوکندری که با تکنیک PCR تکثیر شده بود استفاده گردید. جهت هضم آنزیمی محصول PCR از ۵ آنزیم برشی: *Alu I*، *Hinf I*، *Hinc II*، *Hap II*، *Rsa I* استفاده شد. از ۵ نوع هاپلوتیپ بدست آمده (AAAAA,BBBBB,BBBBC,BBBBD,BBCBC) فقط در یک

مورد از آنها (AAAAA) تشابه بین دو منطقه مورد بررسی پیدا شد. بر اساس نتایج حاصله از این بررسی مشاهده شد که پراکنش هاپلوتیپ ها در این دو منطقه تفاوت معنی دار و بالایی داشته و نشاندهنده تفاوت ذخایر این جمعیتها با هم می باشد.

David Carlini در سال ۲۰۰۱ زیر رده کولئوئیده (Coleoide) را به چهار راسته: Sepioidea (پنج خانواده شامل ماهیان مرکب)، Teuthoidea (۲۶ خانواده از اسکویدها)، هشت پایان و Vampyromorpha تقسیم نمود. براساس داده‌های بدست آمده از توالی‌های ملکولی یک ژن میتوکندریایی (ساب یونیت I سیتوکروم C اکسیداز)، یک ژن هسته‌ای (ایزوفرم B I - اکتین) بررسیهای مختلف انجام گردید. علاوه بر آن جهت تهیه ساختار روابط خویشاوندی داخل و بین این راسته‌ها، از داده‌های توالی ملکولی می‌توان برای تخمین زدن زمان انشعاب آنها استفاده نمود بخصوص هنگامیکه شواهد موجود ناقص می‌باشد.

براساس مطالعه روابط خویشاوندی که توسط Piertney و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بر روی ژن ۱۶S میتوکندری انجام گرفت، Stauroteuthis در خانواده Cirroteuthidae قرارگرفت. این مطالعه پیشنهاد کرد که علاوه بر Cirroteuthidae، خانواده‌های زیر نیز مشخص گردیدند: Opisthoteuthidae (شامل فقط *Opisthoteuthis*)، Grimpoteuthidae (شامل *Grimpoteuthis* و *Luteuthis*).

لازم به ذکر است که امکان وجود اشکال حدواسط بین خانواده‌های تشخیص داده شده کنونی یا جنس‌ها ممکن هنوز کشف نشده باشد.

در سال ۱۹۹۶ Jan Pawlowsky و همکارانش از طریق تعیین توالی ژن ۱۸S rRNA مزوزوآ منشاء آن را بررسی کردند.

مزوزوآ یکی از مهم‌ترین گروههای جانوران زنده هستند. این ارگانیسم مزده‌دار شبه کرم انگل چندین گروه غیر مرتبط بی‌مهره گان دریایی شامل خارپوستان (Echinoderms)، سرپایان، نمرتین‌ها (Nemertines)، کرم‌های پرتار (Polychaetes) و کرمهای پهن هستند. آنها تقارن دوطرفی (bilaterally) دارند، ولی فقط دولایه سلولی داشته و فاقد ارگانهای قابل تشخیص بجز گندها هستند. براساس مطالعات

ریخت‌شناسی، سلول‌شناسی و بیوشیمیایی، مدتهای مدیدی مورد بحث و جدل بوده‌اند که آیا مزوزوآ از جانوران چندسلولی ابتدائی واقعی هستند یا حاصل تغییر ایجاد شده در انگل‌ها می‌باشند.

به دلیل شباهت‌های ریخت‌شناسی آنها با لارو کرمهای پهن و چرخه کامل زندگی، بنظر می‌رسد که مزوزوآ از تغییر کرمهای پهن بوجود آمده‌اند. براساس برخی گزارشات، بهرحال، آنها ممکن است نمونه‌ای حدفاصل بین پروتست‌ها و بیشتر متازوآهای کامل باشند. پیشنهاد شده که مزوزوآ از دو رده رومبوزوآ (Rhombozoa) و اورونکتیدا (Orthonectida) تشکیل شده است. منشاء مزوزوآ نامشخص است. آنها بطور کلاسیک یا بعنوان توربلاریاهای دژنره شده یا بعنوان جانوران چندسلولی ابتدایی درنظر گرفته شدند که با پروتست‌های مژه‌دار رابطه داشتند. به منظور تعیین وضعیت روابط خویشاوندی این گروه، کل ژن ۱۸S rRNA، در گونه (*Dicyema sp.*) و (*Rhopalura ophiocomae*) تعیین توالی گردید. تجزیه و تحلیل‌های این توالی نشان می‌دهد که مزوزوآ در طول تکامل به دو گروه نامتوآها و میکروزوآها منشعب شدند. اطلاعات بدست آمده گواه آن است که منشاء رومبوزوئیدها و اورتونکتیدها از یکدیگر تفکیک شده و احتمالاً جایگاه آنها در همان شاخه بوده و نیازمند اصلاح شدن می‌باشد.

در حال حاضر تجزیه و تحلیل‌های روابط خویشاوندی توالی ژن RNA ریبوزومی چشم‌انداز جدیدی برای مطالعه تاریخ تکاملی متازوآها فراهم نموده است. داده‌های تعیین توالی شواهد جدیدی با یک منشاء منوفیلیتیک متازوآ و انشعاب زودتر مجموعه دیپلوبلاستیک و تریپلوبلاستیک فراهم کرده است.

تجزیه و تحلیل‌های توالی ۵S rRNA از *Dicyema misakiense* نشان داد که dicyemids از قدیمی‌ترین جانور چندسلولی بحساب می‌آیند. بهرحال، این نتایج قابل سؤال هستند زیرا فقط تعداد کمی از نوکلئوتیدها (حدود ۱۲۰ نوکلئوتید در ژن ۵S rDNA در دو نمونه از خانواده dicyemids، (*D. acuticephalum*, *D. orientale*))، نشان دادند که آنها از یک جد تریپلوبلاستیک مشتق شده‌اند.

دراین مطالعه اولین توالی کامل ۱۸S rDNA از اورتونکتید (*Rhopalura achiocomae*) را ارائه نموده و این نتایج را با دیگر توالی‌های یوکاریوتی، شامل توالی‌های جدید از *Dicyema sp.*، dicyemid و *Amphipholis squamata*, ophiuroid، به منظور تثبیت وضعیت روابط خویشاوندی در دو رده شاخه مزوزوآ مقایسه نمودند.

در سال ۱۳۸۲ خانم لیدا شجاعی کاوان به بررسی ژنتیکی جمعیت میگوی سفید (*Metapenaeus affinis*) خلیج فارس و دریای عمان به روش PCR-RFLP بر روی مولکول mtDNA پرداخت. در این بررسی استخراج DNA از عضله میگوهای مورد مطالعه به روش فنل-کلروفرم انجام گرفته و پرایمرهای اختصاصی بر اساس توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم اکسیداز I ژنوم میتوکندری این میگو طراحی و عمل PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام گردید. محصول PCR به طول ۸۱۰ جفت باز برای تمام نمونه ها بدست آمد. جهت مطالعه تفاوت‌های جمعیتی این میگو در سه منطقه مذکور، از تجزیه و تحلیل نتایج RFLP استفاده شد.

محصولات PCR با استفاده از آنزیمهای *Hae III*، *EcoR I*، *Dpn I*، *Cfr ۱۳۱*، *Ava I*، *Alu I*، *Mbo I*، *Hinf I*، *Kpn I*، *Hind III*، *Hinc II*

Taq I، *Rsa I*، *Msp I* مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند و باندهای DNA نمونه ها با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید و رنگ آمیزی نیترات نقره مشاهده گردیدند. با توجه به الگوهای هضم آنزیمی، باندهای ایجاد شده برای ۱۲ آنزیم از ۲۴ آنزیم مورد استفاده در تمام نمونه هادر سه منطقه اهواز، بندرعباس و بوشهر یکسان بوده و در ۲ آنزیم از ۱۴ آنزیم برشی تفاوت دیده شد، به این صورت که آنزیم *Hinc II* در دو نمونه مربوط به منطقه اهواز و آنزیم *Hinf I* در دو نمونه مربوط به بوشهر تفاوت نشان داد. با توجه به نتایج فوق و اینکه تنوع ژنتیکی مشاهده شده در ژن مزبور بسیار محدود بوده است، لذا انجام هر گونه تجزیه و تحلیل آماری برای محاسبه تنوع ژنتیکی و سایر فاکتورهای ژنتیکی امکان پذیر نبود. هیچگونه تمایز جمعیتی بین گروه‌های این میگو در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از ژن مذکور وجود نداشت و احتمالاً تمام ذخایر گونه مورد نظر از یک جمعیت می باشند.

Bonnaud و همکارانش (۱۹۹۶) روابط خویشاوندی سر پایان را از طریق توالی های DNA میتوکندریایی مورد بررسی قرار دادند.

سرپایان یکی از ۹ رده نرم تنان هستند و سرپایان عموماً به دو گروه تقسیم می شوند: زیررده *Nautilodea* و زیر رده *Coleoidea* شامل راسته اکتاپودا (۸ بازو) و دکاپودا (۸ بازو + ۲ تانتاکول).

براساس طبقه‌بندی پذیرفته شده دکاپودها به دو راسته *Teuthoidea* و *Sepioidea* تقسیم می‌شوند. بنا بر نظریه (۱۹۹۷) Voss، راسته *Teuthoidea* شامل اسکوئیدهای *myopsid* و *oegopsid* و راسته *Sepioidea* شامل *Sepiidae* (ماهیان مرکب)، *Sepiolidae*، *Spirulidae*، *Idiosepiidae* و *Sepiadariidae* می‌باشد. موقعیت *Sepiolids* بعنوان یک گروه خواهر از *Sepiids* و اسکوئیدهای منوفیل هستند.

Bonnaud توالی‌های ویژه ژن سیتوکروم اکسیداز III (۵۳۳ جفت باز) برای ۱۷ گونه از سرپایان، ۱۴ دکاپود، ۱۲ اکتاپود، و یک وامپیرومورف (*Vampyromorph*) را بدست آورد. اهداف این مطالعه عبارت بودند از: ۱) مقایسه توالی‌های آمینواسیدی *CoIII* سه گونه از سرپایان با دیگر بی‌مهره‌گان برحسب ترکیب بازی و روابط خویشاوندی آنها. توالی‌های سرپایان به توالی‌های *Katharina tunicata* نسبت به توالی‌های دونمونه *Mytilus edulis* (دوکفه‌ای دریایی) و *Albinaria turrita* (شکم‌پایان)، نزدیک‌تر هستند.

۲) بررسی روابط خویشاوندی بین سرپایان نوکلئوتیدها همانند تنوع توالی‌های آمینواسیدی از یک قطعه *CoIII* با روش‌های پارسیمونی و distance آزمایش شدند. از نکات قابل توجه اینکه گروه *Idiosepius* بعنوان گروه خواهر برخی *oegopsids* و نه *sepioids* یا *sepiolids* بوده و نیز *Vampyroteuthis* گروه خواهر *octopods* می‌باشد. بهر حال، داده‌ها بوضوح روابط خویشاوندی بین راسته دکاپودها را معتبر نمی‌داند.

تجزیه و تحلیل توالی از انتهای 3' ژن ۱-rRNA میتوکندری سرپایان دکاپود نشان داده است که اطلاعات فراهم شده از این ژن برای روابط خویشاوندی در داخل خانواده (*Infrafamilia*) سودمند است (Bonnaud et al., ۱۹۹۴).

مطالعه روابط خویشاوندی بویژه در گروه‌های مهره‌داران، با استفاده از ژن‌های ریبوزومال و ژن‌های انواع سیتوکروم، سیتوکروم *b* (*Cytb*) و سیتوکروم اکسیداز (*COI*, *COII*, *COIII*) انجام گردیده است. دو ژن آخری پیشنهاد شدند که نسبتاً در مهره‌داران محافظت شده می‌باشند.

مطالعه مقدماتی در بی‌مهره‌گان در ۹ گونه (Bonnaud, ۱۹۹۶ و همکاران) نشان داده بود که ژن سیتوکروم اکسیداز *CO III* برای تجزیه و تحلیل نمودن روابط خویشاوندی سرپایان مناسب است. در این بررسی

به منظور تجزیه و تحلیل روابط خویشاوندی سرپایان در یک سطح تاکسونومیک بالا (بطورمثال در سطح راسته) از این ژن استفاده شد. از توالی‌های نوکلئوتید و آمینواسید برای کمک به آشکار نمودن ارتباطات بین دکاپورها و موقعیت *Vampyromorphe* استفاده شد. همچنین برای تعیین روابط خویشاوندی برخی سرپایان با دیگر بی‌مهره‌گان از قطعات ژنی CO II و CO III استفاده گردید.

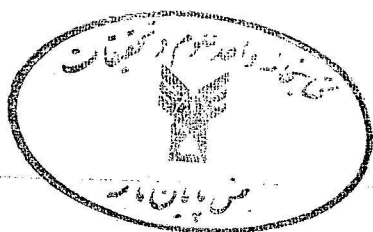
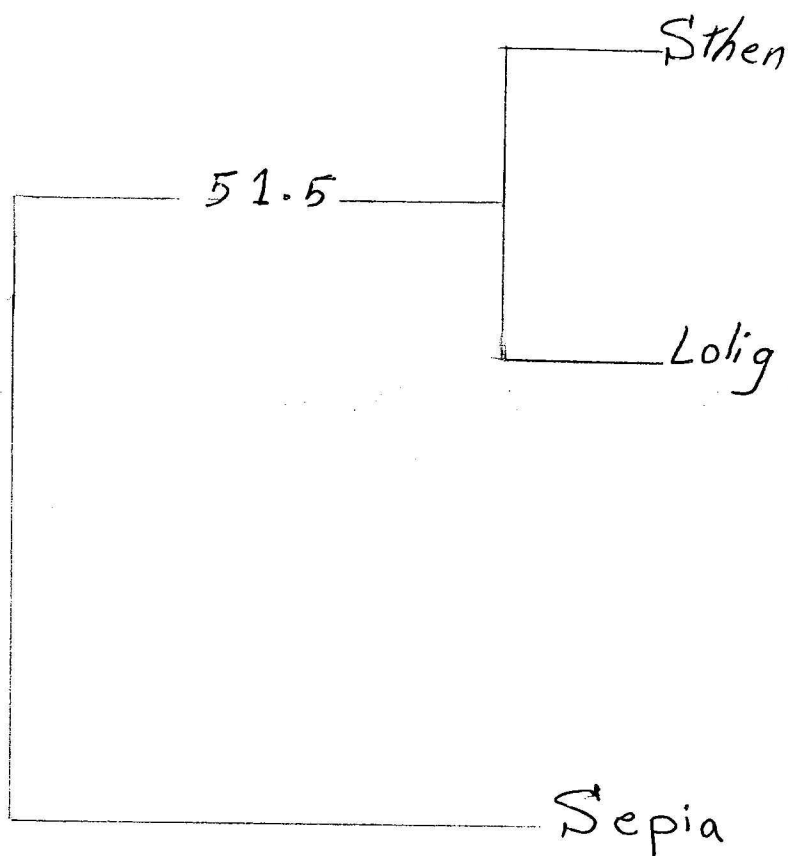
در سال ۱۳۷۹ شبنم اسلامبولچی به بررسی رابطه دو گونه اسکوئید هندی و پشت ارغوانی نسبت به ماهی مرکب پرداخت. در این بررسی پس از الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز یک درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مشخص شد که بهترین نتیجه از بافتهای نگهداری شده در اتانول ۸۰ درصد و روش CTAB حاصل می‌گردد. واکنشهای PCR یک قطعه حدود ۷۰۰ bp از ژن COI را تکثیر نمود. با انتقال محصول PCR هضم نشده بر روی ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد مشاهده شد که در بعضی موارد گونه نرم تن ماهی مرکب بیری حدود ۲۰-۱۰ باز کمتر از دو گونه اسکوئید مورد بررسی دارا می‌باشد. پس از هضم محصول PCR توسط ۱۳ آنزیم مورد استفاده هیچ الگوی پلی مورفسمی مشاهده نشد. ۸ آنزیم از ۱۳ آنزیم مورد بحث در توالی مورد نظر، حداقل در یک گونه نقاط برش داشته‌اند که این آنزیمها به قرار زیر می‌باشند:

Msp I, BamH I, Bcl I, Taq I, Alu I, Mbo I, Hae III, Ava II

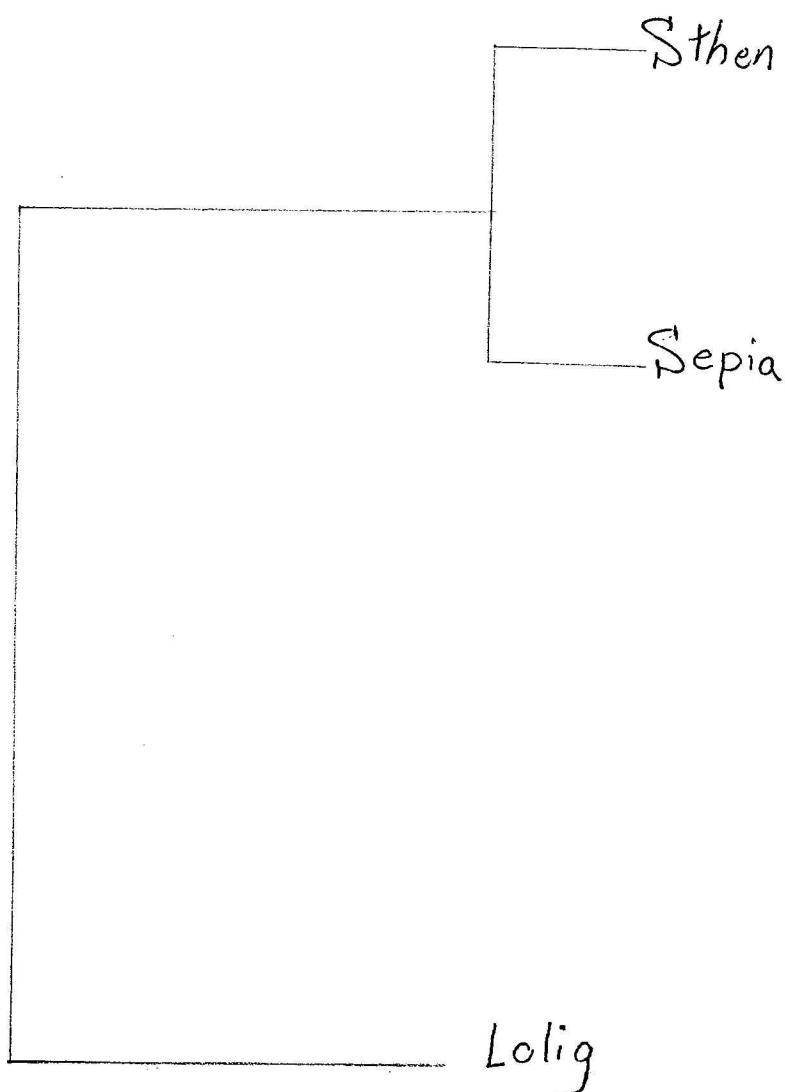
با ترکیب ژنوتیپ‌های ناشی از آنزیمهای مختلف، هاپلوتیپ‌ها به صورت AAAAAAA با ترکیب CACCCABC.BBBBBBBAB مشخص شدند. بررسی RFLP ژن COI در گونه‌های مورد مطالعه ۳ هاپلوتیپ را نشان داد. با استفاده از روشهای UPGMA، N.J RESTML موجود در نرم افزار

PHYLIP روابط خویشاوندی گونه های مورد مطالعه رسم شده است. در دندوگرام حاصل از روش UPGMA مشاهده شد که دو گونه اسکوئید مورد بحث در یک توده قرار گرفتند و این توده با گونه ماهی مرکب بیری توده جدیدی را تشکیل داد.

دندوگرام حاصل از روش اتصال همسایگی (N.J) نیز دو گونه اسکوئید هندی و اسکوئید ارغوانی را در یک توده و توده حاصل را با ماهی مرکب بیری در یک توده قرار داد.



دندوگرام ایجاد شده توسط روش بیشترین شباهت (RESTML) دو گونه اسکوئید ارغوانی و ماهی مرکب ببری را در یک توده و توده حاصل را با اسکوئید هندی در توده جدیدی قرار داد.



در سال ۱۹۹۷ بررسی روابط خویشاوندی Onychoteuthidae (اسکوئید) از سرپایان توسط Bonnaud انجام گرفت.

مطالعه اخیر بر روی روابط خویشاوندی سرپایان، با کاربرد روشهای ملکولی برای حل ارتباطات نامعین برخی خانواده‌های ده‌پایان (اسکوئیدهای myopsid, oegopsid) مفید واقع شده است. خانواده onychoteuthidae شامل ۶ جنس *Onychoteuthis*, *Moroteuthis*، *Ancistroteuthis*، *Chaunoteuthis*, *onykia*, *kondakovia* می‌باشد اما ساختار برخی از اینها هنوز معین نشده است. تجزیه و تحلیل‌های مورفومتریک دو گروه را مشخص نمود، یکی شامل *onychoteuthis* دربرگیرنده *Moroteuthis knipovitchi* و دیگری شامل جنس‌ها یا گونه‌های باقیمانده در سطح بین جنس‌ها. بنظر می‌رسد که جنس *M. knipovitchi* از دیگر گونه‌های این جنس جدا شده و *M. robust* نسبتاً به *M. ingens* و *M. pacifica* وابسته می‌باشد. تجزیه و تحلیل‌های مورفومتریک تصدیق نمود که *Kondakovia longimana* با *M. ingens* متفاوت است. همچنین *onychoteuthis* به روشنی از دیگر جنس‌ها جدا گردید، اما گونه‌های *onychoteuthis* نه براساس خصوصیات جغرافیایی و نه بر پایه اختلافات مورفومتریک نه با اندازه‌گیری پارامترها جدا گردیدند.

ظاهراً برخی نمونه‌ها حد فاصل بین گروههای *Ancistroteuthis*, *Onychoteuthis* بودند. بنا بر یک بررسی مولکولی انجام شده بنظر می‌رسد که Onychoteuthidae منوفیلیک باشد. تجزیه و تحلیل‌های ملکولی نشان داد سه گونه‌هاوایی *Onychoteuthis compata*, *Onychoteuthis sp.B* و *Onychoteuthis sp.C*، ارتباط نزدیک دارند.

مطالعات سیستماتیک و روابط خویشاوندی بطور فزاینده‌ای شامل داده‌های ملکولی همانند داده‌های ریخت‌شناسی است و در صورتیکه از هر دو روش توأماً استفاده شود می‌تواند مفیدتر باشد. در سرپایان و بویژه *Oegopsid squids*، بسیاری از مسائل سیستماتیک مشکل‌ساز می‌گردد. اسکوئیدهای oegopsid متعلق به راسته Teuthoidea شامل ۲۳ خانواده هستند، که ارتباطات بین جنس‌های بسیاری از آنها ناشناخته است. خانواده onychoteuthidae در حال حاضر شامل ۶ جنس و ۱۳ گونه در نظر گرفته می‌شود که برخی گونه‌ها شهرت جهانی دارند، در حالیکه دیگران انتشار محدود داشته‌اند.

در سال ۱۳۸۳ خانم مجبویه حاجی رستملو به بررسی تنوع درون گونه ای و ساختار جمعیتی به روش ژنتیک مولکولی در آرتمیای ایران پرداخت. در این بررسی نمونه بیوماس آرتمیا از منابع مختلف جمع آوری و در آزمایشگاه، استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم انجام گردید. طراحی آغازگر بر اساس ترادف mtDNA آرتمیا و بر اساس توالی ژن rRNAs با جستجو در بانک ژنی NCBI و به طول ۱۸ باز برای دو سر ژن انجام گردید و واکنش PCR صورت پذیرفت. تجزیه و تحلیل محصول PCR به طول ۱۶۰۰ جفت باز با آنالیز RFLP توسط ۱۱ آنزیم برشی انجام گردید:

EcoR I, EcoRV, Fnu II, Hae III, Hind III, Hinf I, Mbo I, Msp I

Rsa I, Taq I, Alu I, Ava II

گرچه قطعات هضم شده در بعضی از آنزیمها دارای تعداد و طول متفاوتی در مقایسه با الگوی هضمی ارائه شده توسط آنالیز کامپیوتری بودند ولی از ۱۰ آنزیم برشی از ۱۱ بکار رفته *Taq I, Alu I, Ava II, Hinf I, Msp I, Mbo I, Rsa I*

Hind III, EcoRV, Hae III

الگوی چند شکلی جمعیتی را نشان دادند که نشانگرهای محل های شناسایی متفاوت بر روی توالی نوکلئوتیدی ژن مزبور بودند و میانگین مجموع اندازه قطعات هضم شده با محصول نهایی PCR مطابقت داشت.

Carlini (۱۹۹۹) با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی های ژن سیتوکروم C اکسیداز روابط خویشاوندی سطح بالاتر در سرپایان Coleoid را تعیین نمود.

تا بحال روابط خویشاوندی سطح بالاتر کلونیدها روشن نشده است. در این بررسی قطعه ای با ۶۵۷ جفت باز از ژن COI میتوکندری از ۴۸ گونه سرپایان را به منظور آزمایش روابط خویشاوندی سطح بالا داخل گروه تجزیه و تحلیل نمودند. ژن COI درجه بالایی از توالی های متغیر نوکلئوتیدی را نشان داد. توالی های آمینواسیدی COI در حد بالایی حفاظت شده بودند، اما در تعیین ارتباطات سطح پایه بین کلونیده مفید بودند. نرخ تکاملی توالی های آمینو اسید COI بطور معنی داری بین دو شجره اصلی متفاوت

بود. اختلاف متوسط توالی‌های آمینواسیدی در Otopodiformes بیش از دوبرابر متوسط اختلاف در Decapod بود.

نتایج زیر از تجزیه و تحلیل‌های توالی‌های COI سرپایان بشرح زیر ارائه می‌گردد:

(۱) Decapoda, Vampyromorpha, Octopoda, Coleoidea گروه‌های منوفیلیک هستند؛

(۲) Octopoda و Vampyromorpha گروه‌های خواهر هستند؛

(۳) Sepioidea که شامل پنج خانواده Idiosepiidae و Sepiadariidae, Sepiolidae, Spirulidae است، پلی‌فیلیک می‌باشند؛

(۴) Spirula بیشتر ارتباط نزدیکی با Teuthoidea دارد؛ Oegopsida، پلی‌فیلیک است.

فرانک اندرسن در سال ۱۹۹۹ به بررسی روابط خویشاوندی و بیوژئوگرافی تاریخی Loliginid (نرم‌تنان؛ سرپایان) براساس داده‌های توالی DNA میتوکندریایی پرداخت.

خانواده Loliginidae سرپایان یک گروه غنی از گونه اسکوئیدهای حاره‌ای و آبهای معتدل کم‌عمق است، بسیاری از آنها اقتصادی بوده و ارگانسم‌هایی هستند که موضوع تحقیقات نوروفیزیولوژیک می‌باشند، اما روابط خویشاوندی این گروه ناشناخته است.

اسکوئیدها Loliginid از نظر ریخت‌شناسی و اندازه بدن تنوع نشان می‌دهند. این خانواده شامل یک گروه بزرگ (طول جبهه بیش از ۴۰ سانتیمتر) اسکوئیدهای شبه - ماهیان مرکب با باله‌های بیضی شکل (Sepioteuthis)، کوچکتر (بطور نمونه طول جبهه بین ۱۰ تا ۱۵ سانتیمتر) گونه‌هایی با دم طویل در رأس انتهایی جبهه (*Loligo [Alloteuthis]*)، و چندین گونه ماهیچه‌ای، اسکوئیدهای شناگر قوی با باله‌های سه گوش (برای مثال گونه *Loligo*) می‌باشند. علاوه برآن، چندین گونه *Loliginid* باکتریهای پرتوافشانی در سطح شکمی خود (درمحل خروج جوهر کیسه مرکب) (*Uroteuthis*) دارند.

پراکندگی وسیع این گروه غنی از گونه آنرا بعنوان یک نمونه باارزش مطالعه برای بررسی بیوگرافی و کلاوژنزیس (*Cladogenesis*) دریای کم‌عمق تبدیل می‌کند. برخی تئوریه‌ها ارتباط زمین‌شناسی و کلاوژنزیس در خانواده Loliginidae را تأیید می‌کنند.

در سال ۱۹۹۹ اندرسن پیشنهاد نمود که کلاوژنزیس لولیگنیده با تئوری تفکیک قاره‌ای همبستگی نزدیکی دارد.

برای روشن نمودن روابط خویشاوندی Loliginid، اندرسن (۲۰۰۰) نواحی از دو ژن میتوکندریایی (ژنهای ۱۶S rRNA و ساب یونیت I سیتوکروم C اکسیداز) را برای اعضا ۱۹ گونه Loliginid و چندین گروه خارجی تعیین توالی نمود. تجزیه و تحلیل‌های روش پارسیمونی و ML (Maximum-likelihood) براساس ترکیب یک سری از اطلاعات تکمیل شده است. بطوریکه تجزیه و تحلیل‌های اطلاعات ترکیبی، منوفیلی Loliginid را حمایت کرده و چهار گروه (Clade)، یکی شامل گونه‌هایی در آبهای آمریکا از دو جنس، دیگری شامل ۳ گونه آتلانتیک شرقی، و دیگری شامل لولیگینیدهای پرتوافشان (bioluminescent) بعلاوه *Loliolus Japonica* و یکی بوسیله یک جفت لولیگو *Subulata – Loliguncula mercatoris* (Alloteuthis) مشخص نمود.

تست‌های متغیر تئوری‌های کلاوژنزیس Loliginid پیشنهاد می‌کند که کلاوژنزیس در Loliginidae بستگی به پهنه آتلانتیک و محصور شدن دریای تیس (Tethys) دارد، گرچه پراکندگی از پاسیفیک غربی - هند یک دلیل توضیح دهنده برای منشاء گروه‌های لولیگینیدهای آمریکایی است.

برای روشن کردن روابط خویشاوندی لولیگینید، داده‌های توالی DNA برای ۱۹ گونه لولیگینید از نواحی دو ژن میتوکندریایی: ژن ساب یونیت بزرگ (۱۶S) ریبوزومال RNA (انتهای 3') و ژن ساب یونیت I سیتوکروم C اکسیداز (COI) استفاده گردید. ژن S ۱۶ براساس پیشنهادات منتشر شده که این ژن ممکن است در سطح داخل خانواده در سرپایان مفید باشد، انتخاب شد (Bonnaud et al., ۱۹۹۴). توالی داده‌ها هم بطور جداگانه و هم با روش MP (Maximum-Parsimony) و روش ML (Maximum-likelihood) تجزیه و تحلیل گردید. تئوری‌های دیگر ارتباطات Loliginid و الگوهای کلاوژنتیک با شجره‌های ML مقایسه شدند و براساس این داده‌ها، و احتمال همبستگی زمین شناختی با کلاوژنزیس ارزیابی شد.

هر دو تجزیه و تحلیل‌های MP و ML مجموعه داده‌های ترکیب شده افق جدید در بیوژئوگرافی و تکامل اسکونید Loliginid گشود. تجزیه و تحلیل‌های مجموعه داده‌های ترکیب شده الگوی ارتباطات روشن می‌سازد که Loliginidae، منوفیلیک می‌باشد.

همچنین Bonnaud و همکاران (۱۹۹۴) پیشنهاد نمودند، Sepiolids بنظر نمی‌رسد که براساس این داده‌ها ارتباط نزدیک با Loliginids داشته باشند. این پیشنهاد که *Ctenopteryx* تاکسان خواهر

lolidinids است در این تجزیه و تحلیل مورد تأیید قرار نمی‌گیرد. در برابر این یافته‌ها، این داده‌ها ممکن است خصوصاً برای ارزیابی ارتباطات درونی گروه‌های خارج مفید باشد.

رویه‌مرفته روش مرکب از ML و شجره پارسیمونی نتایج مشابهی ارائه می‌نماید. هردو روش پارسیمونی و ML ویژگی‌های معتبری را ارائه می‌نماید.

Warnke و همکاران (۲۰۰۰) به بررسی تنوع توالی DNA اختاپوس با استفاده از ژن III سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی (mt CO III) پرداختند.

در این بررسی یک قطعه ۶۱۲ bp از ژن mt CO III تعیین توالی شد. شجره ژنی mt COIII دو دسته اصلی را آشکار کرد، یکی شامل *O. rubescens*, *O. dofleini* و *O. californicus* و دیگری شامل همه نمونه‌های *O. vulgaris*, *O. bimaculatus*, *O. bimaculoides* و *O. mimus* می‌باشد.

براساس شجره ژنی mt CO III حضور گونه‌های پنهان بین اختاپوس‌های شبیه به *O. vulgaris* پیشنهاد می‌شود.

Warnke و همکارانش (۲۰۰۳) وضعیت روابط خویشاوندی *Spirula* (از سرپایان) را براساس شواهد مقدماتی از ژن RNA ریبوزومال ۱۸ S مورد بررسی قرار دادند.

آنها به‌منظور یک مطالعه متمرکز بر وضعیت روابط خویشاوندی *Spirulida*، توالی‌های DNA تولئوئیدهای پنج گونه از سرپایان *Loligo vulgaris*, *Sepia officinalis*, *Sepietta sp* (Eledone), *Histioteuthis sp*, *I. llex coindetii*, *cirrrosa* از دریای مدیترانه (Banyuls, فرانسه) همانند *Spirula spirula* از اقیانوس آتلانتیک غربی (Canary ایسلند) را بدست آورده و با کاربرد روش‌های مختلف (ML, MP, NJ) تجزیه و تحلیل نمودند. بنظر می‌رسد که *Spirula* قدیمی‌ترین گونه دکابراکیا عصر حاضر می‌باشد.

نمونه Ram's Horn Squid *Spirula* یکی از غیرمعمول‌ترین سرپایان در حال حاضر می‌باشد که شامل یک محفظه صدفی منحصر به فرد است. براساس مشاهدات ریخت‌شناسی مغز و استاتوسیست‌ها بوسیله Youn (۱۹۸۱)، Engeser, Bandel (۱۹۹۸) *Spirula* را بعنوان قدیمی‌ترین شکل از دکابراکیا عصر حاضر بحساب آوردند. همچنین یک شباهت شگفت‌آور مشابه گروه - خواهر از *Coleoidea* با زیررده *Ammonoidea* وجود دارد، به این دلیل که پوسته محفظه اولیه بنظر یکسان می‌رسد.

بهرحال، در بیشتر مطالعات سیستماتیک برپایه ویژگیهای ریخت شناسی، درخصوص *Spirula* هنوز بحث باقی است. به عبارتی دیگر داده‌های ملکولی، به عقاید متناقض درخصوص وضعیت *Spirulida* بویژه گروه خواهر پیشنهاد شده از *Spirula* منتهی شده است.

در بررسی انجام گرفته درخصوص تفاوت‌های ژنتیکی در (*Sepia pharaonis*) و (*Sepia officinalis*) ساختار ژنتیکی انواع سرپایان (*Cephalopods*) با کاربرد آنالیزهای RFLP و تعیین توالی بازهای DNA (DNA sequencing) مورد مطالعه قرار گرفت. در این تحقیق گونه‌های سپیافارا اونیس و سپیا اوفی سینالیس و اسکالوپ‌های اوپریمنا (*Euprymna scolopes*) که گونه‌های متفاوتی هستند بررسی شدند و معلوم گردید که برای از تنوع ژنتیکی گونه‌ها با استفاده از این دو تکنیک مولکولی کشف خواهد شد.

Bonnaud و همکاران (۱۹۹۶، ۱۹۹۴) همانند Carlini و Grves (۱۹۹۹) ارتباطات بین کلئوئیدها (*Coleoids*) را با بکارگیری قطعات ژنهای rRNA ۱۶، COI و CO III بررسی کردند. تمامی توالی‌های آزمایش شده سطوح معنی‌داری از اشباع‌پذیری، که یک نشانه برای تشابه ساختمانی است را نشان دادند. بدنبال آن Carlini و همکاران (۲۰۰۰) خانواده ژن اکتین شدیداً محافظت شده را برای امتحان مجدد ارتباطات سطوح بالاتر در *Coleoidea* انتخاب کردند. نتایج آنها نشان داد که راسته *Sepioidea* احتمالاً منوفیلتیک نیست، اما وضوح بیشتر در مرود موقعیت *Spirula* بدست نیامد. دراین بررسی داده ملکولی جدید که به دریافت داده‌های اساسی برای تشخیص وضعیت روابط خویشاوندی *Spirula* در زیر رده *Coleoidea* منتهی می‌شود ارائه گردید.

همچنین ژن ۱۸ S rRNA هسته‌ای جهت آشکار نمودن روابط تاکسونومیک در سطوح بالاتر نیز مورد استفاده قرار گرفت.

Warnke و همکارانش (۲۰۰۲) در بررسی وضعیت روابط خویشاوندی *Spirula* بااستفاده از ژن ۱۸S rRNA به نتایج زیر رسیدند:

طول توالی‌های سرپایان از ۱۸۶۰ نوکلئوتید در *Loligo vulgaris* تا ۲۲۲۲ نوکلئوتید در *Spirula spirula* متغیر بود. توالی‌ها غنی از G/C بودند (G=۳۲٪, C=۲۸٪, T=۲۱٪, A=۱۹٪) کل مسیر طول توالی‌های ۱۸S rDNA کامل، هشت نمونه از سرپایان و دونرم تن دیگر (*Liolophura japonica*, *Nodilittorina punctata*) شامل ۲۵۸۳ جایگاه بود. سه ناحیه بسیار متغیر پیدا شد. پس از باقی ماندن ۸۶۴ موقعیت مبهم طول مسیر پایانی ۱۷۱۹ جایگاه بود.

تمامی شجره‌های MP پیش‌بینی شده از مجموعه داده‌ها با تغییر دادن نمونه‌های خارج گروه توپولوژی یکسانی را نشان می‌دهد (داده‌ها نشان نمی‌دهد).

بعد از تعیین وضعیت روابط خویشاوندی Spirulida مشخص گردید که تعداد محدودی از گونه‌های نشان داده شده گروه‌های اصلی بعنوان یک گونه منفرد محسوب می‌گردد.

توالی‌های DNA, ۱۸S rDNA از سرپایان بنظر طویل می‌رسند. اگرچه ژن بطور کامل تعیین توالی نشده است. بطور طبیعی، ۱۸S rDNA بین ۱۷۰۰ و ۱۹۰۰ نوکلئوتید دارد.

در این مطالعه، روش‌های بکار گرفته شده برای ترسیم شجره (ML, NJ, MP) یک اثر قوی بر شجره توپولوژی داشت. روابط خویشاوندی در ML مشابه نیستند زیرا تمامی داده‌های ریخت‌شناسی مطالعات قبلی با موقعیت ظاهری Eledon در دکابراکیا منطبق هستند (Boletzky, ۱۹۹۹). بهر حال، منوفیلی دکابراکیا بوسیله انواع مطالعات ملکولی هردو تجزیه و تحلیل‌های NJ و MP مورد تأیید قرار گرفت (Bounnaud et al., ۱۹۹۶, ۱۹۹۴).

Carlini و همکارانش (۲۰۰۱) ژن I و II اکتین را با روش ML تجزیه و تحلیل کردند. دکابراکیا هر چند توپولوژی‌های مختلف در بین جنس‌های آن مشاهده می‌شود ولی شواهدی برای منوفیلی آنها بدست آمد. همچنین آنها پیشنهاد کردند که به هنگام شفاف‌سازی روابط خویشاوندی به کمک توالی‌های ۱۸ S rDNA و نیز بوسیله ویژگی‌های خاص نواحی حفاظت شده و متغیر (مانند نرخ جهش، شمارش AT و طول) در نمونه‌های مختلف اختلاف دیده می‌شود. نواحی متغیر (بنظر حلقه‌ها ۱۰۰ ps می‌باشند) نرخ تکامل بالا دارد، مسیرهایی همچون این نواحی که از تجزیه و تحلیل‌های فوق بدست آمدند ممکن است مطلوب نباشد. بهر حال، کاربرد وسیع جایگاه‌های محافظت شده، ممکن است از عدم وجود اطلاعات روابط خویشاوندی

ناشی شده باشد. داده‌های ملکولی با تئوری Engeser و Bandel (۱۹۹۸) مطابقت می‌نماید و نشان می‌دهد که Spirula گروه خواهر همه دکابراکیا عصر حاضر می‌باشد.

در هر حال نتایج بدست آمده در همان مراحل ابتدائی باقی می‌ماند زیرا توالی‌های ژن rRNA ۱۸S کامل نبوده و تجزیه و تحلیل‌های انجام شده قادر به حذف تمامی موارد شک برانگیز نمی‌باشد. بنابراین مهم است ترادف‌ها و تجزیه و تحلیل‌های بعدی این نواحی ژن را کامل نمود. بهر حال، آزمایش تئوری Engeser و Bandel (۱۹۸۸)، داده‌های بیشتر ملکولی و ریخت‌شناسی جهت کامل نمودن نواحی ژن مزبور مفید خواهند بود.

Carlini و همکارانش (۲۰۰۰) تکامل خانواده ژن Actin و روابط خویشاوندی کلتوئید (سرپایان) را مورد بررسی قرار دادند.

تجزیه و تحلیل‌های روابط خویشاوندی با استفاده از یک قطعه ۷۸۴ bp از توالی‌های ژن اکتین ۸۲ از ۴۴ کلتوئید، با نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل‌های ساترن بلات ژنومی، وجود حداقل سه جایگاه مجزای ژنومی اکتین در کلتوئیدها (Coleoids) را تصدیق نمود. ایزوفرم‌های اکتین با تجزیه و تحلیل‌های روابط خویشاوندی تعیین توالی‌های سرپایان موجود از هر یک از سه ایزوفرم، با ترجمه توالی‌های cDNA، اکتین از یک بانک ژنی راند شده تاکسار متازونا (metazona) مشتق شده از یک ردیف توصیف گردید. یکی از سه ایزوفرم‌های یافت شده در سرپایان ارتباط نزدیکی با توالی‌های اکتین‌ها در بافت ماهیچه‌ای دیگر نرم‌تنان داشت. ایزوفرم دوم بسیار با توالی‌های آمینواسید اکتین اختصاصی سیتوپلاسمی شبیه بود. نوع اکتین‌های موجود در ماهیچه نرم‌تنان ذکر شده از سایر بندپایان (Arthropoda) مجزا می‌باشد.

Jan Strugnell (۲۰۰۰)، نرخ تکامل روابط خویشاوندی و ارزیابی رویدادهای زمان انشعاب در سرپایان را بررسی نمود.

رده سرپایان (شاخه نرم‌تنان) شامل اختاپوس‌ها، اسکوئیدها، ماهیان مرکب و نوتیلوس‌ها می‌باشد. اگرچه بیشتر خانواده‌های سرپایان موجود بخوبی تعیین شده‌اند، اما روابط خویشاوندی بین آنها بحث‌انگیز است. به منظور مشخص نمودن این روابط، سه ژن میتوکندریایی (COI, ۱۲S rRNA, ۱۶S rRNA) و سه ژن هسته‌ای (Pax-6, اوکتوپین دهیدروژناز و ردوپسین) تعیین توالی شدند.

Cohen (۱۹۹۲) با استفاده از توالی‌های ژن ۱۸S rDNA روابط خویشاوندی براکیوپودها را بررسی نمود. وی اولین گواه شجره‌ای را برای ارتباطات بین همه شجره‌های اصلی موجود در براکیوپود، را با یکدیگر و با داده‌ها ارائه نمود.

از سال ۱۹۹۵ به بعد، شواهد ژنتیکی مستقل از mt DNA ارتباط پروتواستوم را نشان داده و همچنین شجره ژن ۱۸S rDNA برای ناحیه حلقه کوتاه (Short-loop) را تصدیق نمود. در نهایت مشخص شد که phoronids، الزاماً منوفلیتیک هستند.

Kazuyoshi ENDO (۲۰۰۱)، وضعیت روابط خویشاوندی براکیاپودها را با توجه به ژنهای میتوکندریایی راسته‌ها مورد بررسی قرار داد.

وجوه اشتراک براکیوپودها به سایر جانوران بیش از یک قرن دانشمندان را متحیر نموده بود. مطالعات اخیر براساس تعیین توالی ژن ۱۸S rRNA بوضوح اشاره می‌کند که براکیاپودها پروتواستوم هستند و بوضوح به یک لارو تروکوفور همانند کرمهای حلقوی (*Sipunculans* (annelids) و نرم‌تنان شباهت دارند. تجزیه و تحلیل‌های نشانگرهای ملکولی دیگر شامل فاکتور ژن آلفا ۱ و برخی ژنوم میتوکندریایی، بطور وسیعی این نظریه را حمایت می‌کند. روشن نمودن ارتباطات بین Eutrochozoans، بهر حال، هنوز یک وظیفه اساسی محسوب می‌گردد و احتمالاً به این حقیقت که اجداد این شاخه در طی یک دوره کوتاه مشتق شده‌اند، اشاره می‌کند.

نقشه‌های ژن میتوکندریایی ۸۹ متازوا (metazoans) شامل دو براکیاپود، ۹ شاخه جانوری حاضر برای تعیین الگوهای ارتباطی بررسی شدند. موقعیت‌های ارتباطی ژنهای tRNA می‌توند داخل شاخه تغییر کند و فقط ترتیب ۱۳ پروتئین و دوژن rRNA در این مطالعه در نظر گرفته شدند. مشاهدات پیشنهاد می‌کند که نقشه ژنتیکی نرم‌تن برای نقشه‌های براکیا بود و کرمهای حلقوی، اجدادی است و آن براکیاپودها بطور نسبتاً زیادی به کرمهای حلقوی بیشتر از نرم‌تنان وابسته‌اند.

قبلاً نیز اشاره گردید که Kerstin Warnke و همکارانش (۲۰۰۳) نتایج اولیه از بررسی ملکولی روابط خویشاوندی سرپایان موجود را ارائه نمودند بطوریکه با تنوع DNA پنج گونه سرپایان *Loligo* (*Eledone moschata* و *Octopus vulgaris* *Illex coindetii* *Sepia officinalis* *vulgaris*) از مدیترانه (فرانسه، Banyuls) از گونه‌های *Histioteuthis* از اقیانوس آتلانتیک غربی

(Canary ایسلند و Fuerteventura) و از *Nutilus pompilius* از اقیانوس پاسیفیک غربی با استفاده از قطعه (در حدود 400 bp) از ساب یونیت کوچک ژن S rRNA 18 هسته‌ای تعیین گردید. این نتایج مبین آن است که منوفیلی سرپایان موجود، *Decabrachia, octobrachia* را اثبات می‌نماید. بهر حال روابط خویشاوندی در دکابراکیا برپایه داده‌های توالی انجام شده مشخص نگردید.

تعیین توالی‌های بعدی به دستیابی روابط خویشاوندی نیاز دارد و قادر به تعیین ساعت مولکولی برای سرپایان نمی‌باشد.

Michael Syvnen (2002)، نرخ تکامل RNA ریپوزومال را بطور منحصراً به فردی در یوکاریوت مورد بررسی قرار داد.

با استفاده از یک روش نرخ وابستگی تکامل تعیین شد. در این روش، فاصله کامل برای دو ژن متفاوت مشتق شده از همان گروه گونه‌ها با تعیین کامل توالی‌های ژنومی نرخ وابستگی تکامل بدست می‌آید.

ساعت مولکولی RNA ریپوزومی از یوکاریوت‌ها بطور منحصراً به فردی تسریع شده و نسبتاً متنوع می‌باشد. این خصوصیات ساختمانی تکامل rRNA یوکاریوتی با چهار ژن پروتئین مختلف، همچنین از آزمایش تعیین نرخ ماتریکس - فاصله که شامل رسم کردن فاصله یک ژن (از دو گونه مختلف) در برابر فاصله آن از ژن دوم می‌باشد به کل یک نقشه ساده X-Y استفاده گردید.

این آزمایش برای پروتئینهای 11 rps, 114 rp . SSU rRNA بکار برده شد. بعلاوه تکامل سیتوکروم C و سیتوکروم C اکسیداز از یک گروه بزرگتر یوکاریوت‌ها با یکدیگر و با ssu rRNA آن مقایسه گردید. انجام آزمایش نرخ ماتریکس - فاصله معرفی شد در این مطالعه به عدم وجود نرخ‌های تکاملی فرضی در نظر گرفته شده، زمان‌های اشتقاق، یا روابط فیلوژنیک مرتبط می‌باشد. جزئیات بیشتر بنیادی و تحقیقات کاربردی روی سرپایان مانند سیستماتیک، ریخت‌شناسی، جنین‌شناسی، ژنتیک جمعیت‌ها و تنوع زیستی از سال 1960 کامل شده است (Lu, 1998 ; Dong, 1998).

اطلاعات مولکولی از داده‌های DNA برای روشن شدن ارتباطات بین سرپایان (cephalopoda) از 1990 بکار برده شده است. تنوع نوکلئوتیدی توالی‌های یک ژن یا بخشی از ژن از ژنوم میتوکندریایی یا هسته‌ای می‌تواند بطور خویشاوندی تجزیه و تحلیل شود. تعیین توالی DNA تنوع و ارتباط خویشاوندی هشت پایان

(octopods) با استفاده از زیرواحد I سیتوکروم اکسیداز C میتوکندری (mt COI ، mt CoII ، mt III ژن ۱۶S rRNA بررسی شده است

(Carlini et al.'۲۰۰۱; Piertney et al.'۲۰۰۳).

در سال ۱۳۸۱ خانم فریبا عطایی به بررسی تنوع ژنتیکی تاسماهی ایران (*Acipenser persicus*) در رودخانه سفید رود با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP روی mtDNA و اطلاعات مرفولوژیکی پرداخت. در این تحقیق ناحیه کنترل mtDNA با استفاده از PCR تکثیر شد و متعاقب آن نمونه های DNA با آنزیمهای برشی برای تجزیه و تحلیل RFLP هضم گردید. در ابتدا ۲۴ آنزیم برشی مورد بررسی قرار گرفت. سپس آنزیم های پلی مورفیک انتخاب و ۳۰ نمونه از هر منطقه توسط آنها هضم گردید. در این بررسی تعداد ۱۸ هاپلوتیپ تعیین گردید که از بین هاپلوتیپ های شناخته شده فراوانی ۴ هاپلوتیپ بیشتر از سایرین بوده و بقیه هاپلوتیپ ها نادر بودند. هتروپلاسمی در تمام نمونه ها دیده شد. استفاده از آنالیز کلاستر و تجزیه به مولفه های اصلی PCA نشان داد که در گونه *A. persicus* از سه منطقه بر اساس صفات ریختی استفاده شده در مطالعه حاضر جدایی و تمایز وجود ندارد. نتایج مطالعه حاضر مشخص کرد که جمعیت های مورد مطالعه همگن بودند و پیشنهاد می شود که برای آشکار کردن چند شکلی، از تکنیک های مولکولی دیگر مانند AFLP، RAPD Sequencing، استفاده شود.

در سال ۱۳۸۱ آقای قاسم محمدی کاشانی به مطالعه جمعیتی شاه میگو *Panulirus homorus* با استفاده از تجزیه و تحلیل های عددی و مولکولی پرداخت. در این مطالعه نمونه های شاه میگوی دریای عمان *Paulirus homarus* در آبهای سواحل استان سیستان و بلوچستان مورد بررسی قرار گرفت. بررسیهای مورفومتریک و مریستیک و مولکولی به روش PCR-RFLP به منظور بررسی ساختار جمعیتی این گونه در مناطق مختلف انجام شد. مطالعات مولکولی، ناهمگنی ژنتیکی را بین مناطق مختلف نمونه برداری نشان نداد. مطالعات مریستیک و مورفومتریک با نتایج حاصل از مطالعات مولکولی سازگار بود.

ارتباط فیلوژنتیک میان سرپایان ده آبششان (*Decabrachia cephalopods*) با استفاده از تعیین توالی بازهای mt DNA توسط Zheng و همکاران، در سال ۲۰۰۴ بررسی گردید. برای تشخیص ارتباط فیلوژنی بین سرپایان ده آبششی بویژه در خانواده های *Sepiidae* و *Sepiolidae* ژن سیتوکروم C

اکسیداز ساب یونیت I (CoI) و ژن قطعه ۱۷S rRNA برای ۱۳ گونه تعیین توالی شد. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی از طریق روش ایجاز (Parsimony) انجام شد. زیررده کلوئیده (Coleoids) به دو شجره هشت آبششان (octobranchia) و ده آبششان (decabrachia) (شامل Sepiolidae, sepiidae و توتیدا Teuthida) تقسیم شدند. در تمام شجره‌نامه‌های خویشاوندی (phylogenetic)، مونوفیلی Sepiolidae و Sepiidae بخوبی حفظ گردیده است اما ترتیب و موقعیت آن در ده آبششان مشخص نبود (Nesis, ۱۹۸۲).

براساس بخشی از COI rDNA و تعیین توالی آمینو اسیدهای آن تجزیه و تحلیل‌های روش پارسیمونی نشان داد که خانواده‌های Sepiolidae, Sepiidae و (لولیگوی چینی *Loligo chinensis*) از راسته توتیدا Teuthida در یک سطح بودند. مقایسه Sepiolidae, Sepiidae به نسبت زیاد به استفاده از تعیین توالی ۱۶S rDNA راسته توتیدا بستگی داشت. Sepiolidae و Sepiidae به دو راسته مختلف متعلق هستند، براساس تجزیه تحلیل خویشاوندی، دوجنس (*Sepia* و *Sepiella*) از Sepiidae می‌تواند قابل تشخیص باشد (۷۸٪ اتصال مجاور (NJ) و ۶۴٪ پاریسومی در ژن ۱۶S rRNA). برطبق این بررسی ژن COI ممکن است جهت تجزیه و تحلیل روابط خویشاوندی ماهیان مرکب در سطح تاکسونومی مناسب باشد، و همچنین ژن ۱۶S rRNA می‌تواند بعنوان یک ابزار گرانها برای تجزیه و تحلیل ارتباطات تاکسونومیک در سطح جنس‌ها استفاده شود.

Zheng و همکاران (۲۰۰۴) روابط خویشاوندی بین سرپایان Decabanchia را از طریق توالی DNA میتوکندریایی بررسی نمودند. جهت کشف روابط خویشاوندی بین سرپایان Decabanchia بویژه خانواده Sepiidae و Sepilidae، ژن زیر واحد I سیتوکروم اکسیداز C میتوکندریال (COI) و ژن ۱۶S rRNA برای ۱۳ گونه سکوانس گردید. تجزیه و تحلیل روابط خویشاوندی با روش فاصله (Distance) و روش ایجاز (Parsimony) صورت گرفت. Carlini و همکاران (۱۹۹۹) یک تجزیه و تحلیل سطوح بالاتر سرپایان Coleids را انجام دادند و Coleids را با دو رده عمده تقسیم نمودند: Octabranchia و Decabranchia (شامل Sepiidae, Sepiidae, Teuthida).

در تمامی شجره‌های روابط خویشاوندی، مونوفیلی (تک تباری) Sepiolidae و Sepiidae مورد تایید قرار گرفت اما رتبه و موقعیت در درون Decabanchia روشن نبود.

سکوانس های COI rRNA و توالی آمینواسیدهای با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های روش ایجاز توانست نشان دهد که Sepiidae و Sepiolidae و شاخه *Loligo chinesis* و *Ctenoptery sicula* از Teuthida در یک سطح و کلاس بودند. در مقایسه با Sepiidae، معلوم شد که Sepiolidae رابطه نزدیکی با Teuthidae دارند که این امر با کمک سکوانس های rDNA ۱۶s روشن شد.

Sepiidae و Sepiolidae به راسته های مختلفی تعلق دارند. طبق تجزیه و تحلیل روابط خویشاوندی ۲، جنس (*Sepia*, *Sepiella*) از Sepiidae را میتوان از همدیگر تشخیص داد (۷۸ درصد روش اتصال همسایگی (N.J) با حداکثر ۶۴ درصد روش ایجاز (Parsimony) در ژن rRNA ۱۶s)، ولی خط اتصال مشهودی با استفاده از ژن COI و داده های مربوط به آمینواسید آن وجود ندارد که دلالت بر این امر دارد که ژن COI جهت تجزیه و تحلیل روابط خویشاوندی ماهی مرکب در سطح تاکسونومیک بالا (مثلا خانواده) بهتر قابل درک بوده و ژن rRNA ۱۶s را می توان به عنوان ابزار ارزشمندی برای تجزیه و تحلیل نمودن روابط تاکسونومیک در سطح جنس بکار بست.

طبق نظر Voss (۱۹۷۷)، راسته Sepioidae شامل خانواده های Spirulidae, Sepiidae, Sepiolidae, Idiosepiidae, Sepiadariidae می باشد. تا به امروز این این سیستم طبقه بندی در کشور چین مورد استفاده است. موقعیت Sepiolidae به عنوان گروه خواهر Sepiidae توسط برخی صاحب نظران مورد تردید بوده است (از جمله Clark, ۱۹۹۸ and Boletzky, ۱۹۹۹).

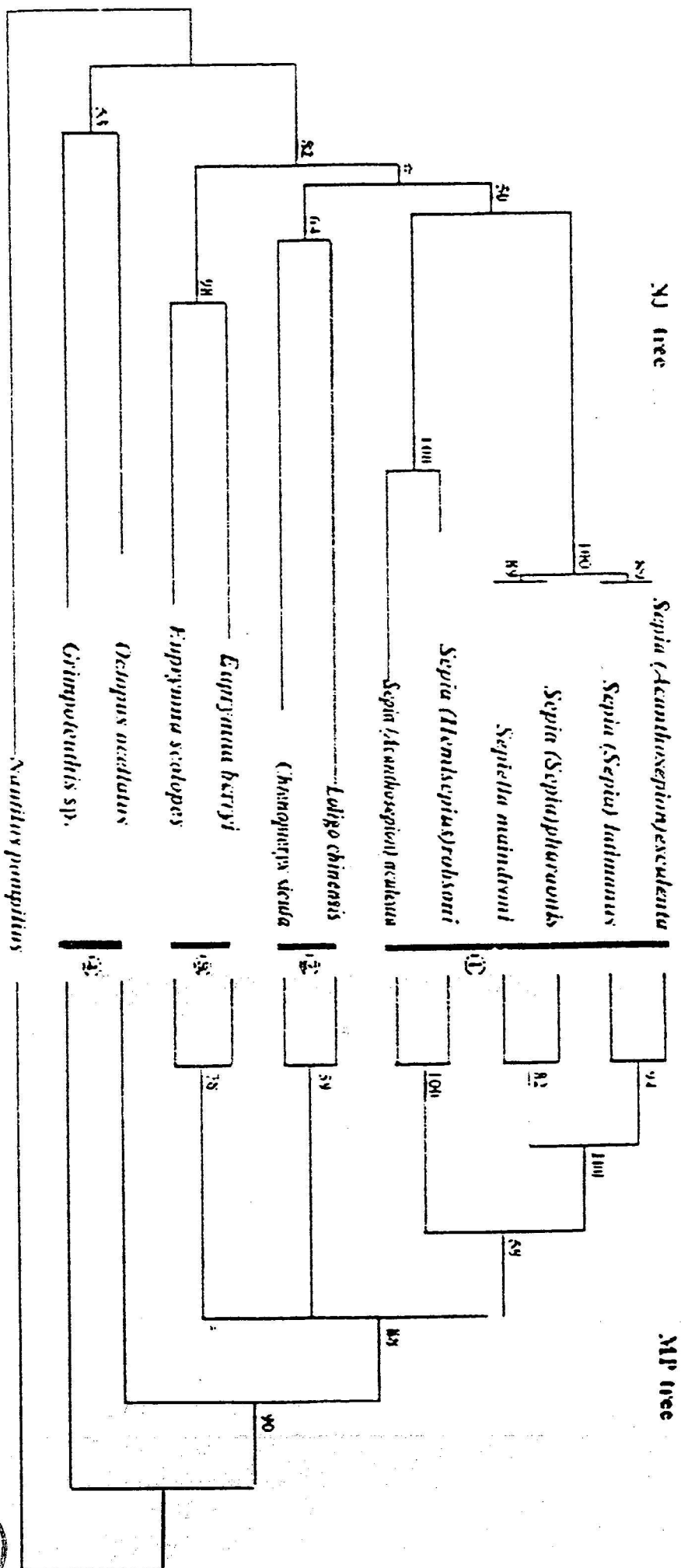
اطلاعات مولکولی بدست آمده از داده های DNA برای کشف روابط میان سرپایان از دهه ۱۹۹۰ تاکنون بکار گرفته شده است. تنوع نوکلئوتیدی بین سکوانس یک ژن یا بخشی از یک ژن از ژنوم میتوکندریایی یا هسته ای را می توان از لحاظ روابط خویشاوندی تجزیه و تحلیل نمود. تنوع سکوانس DNA قبلی و روابط خویشاوندی در Octapoda با کمک زیر واحد I سیتوکروم اکسیداز C میتوکندریال (mt COI)، mt COII و mt COIII ژن rRNA ۱۶s مورد تحقیق قرار گرفته است.

فرانک آندرسون (۲۰۰۰) دو ژن میتوکندریایی (COI, ۱۶s rRNA) را جهت تعیین روابط خویشاوندی Lolignid سکوانس نمود. تجزیه و تحلیل سکوانس از انتهای ۳ ژن (۱۶S) mt ۱-rRNA در سرپایان

Decapoda معلوم ساخت که این بخش از ژن ابزار مفیدی برای روابط تاکسونومیک در سطح زیرخانواده می باشد.

ژن COI برای تجزیه و تحلیل روابط خویشاوندی در سرپایان Coleid میزان بالایی از تنوع و تغییرات سکوانس نوکلئوتیدی را نشان داد.

در شکل صفحه بعد روابط تاکسونومیک در ۱۳ گونه از سرپایان Decabrachia توسط مقایسه سکوانس rRNA ۱۶s و ژن COI تجزیه و تحلیل گردیده و شجره های روابط خویشاوندی بازسازی شده اند:



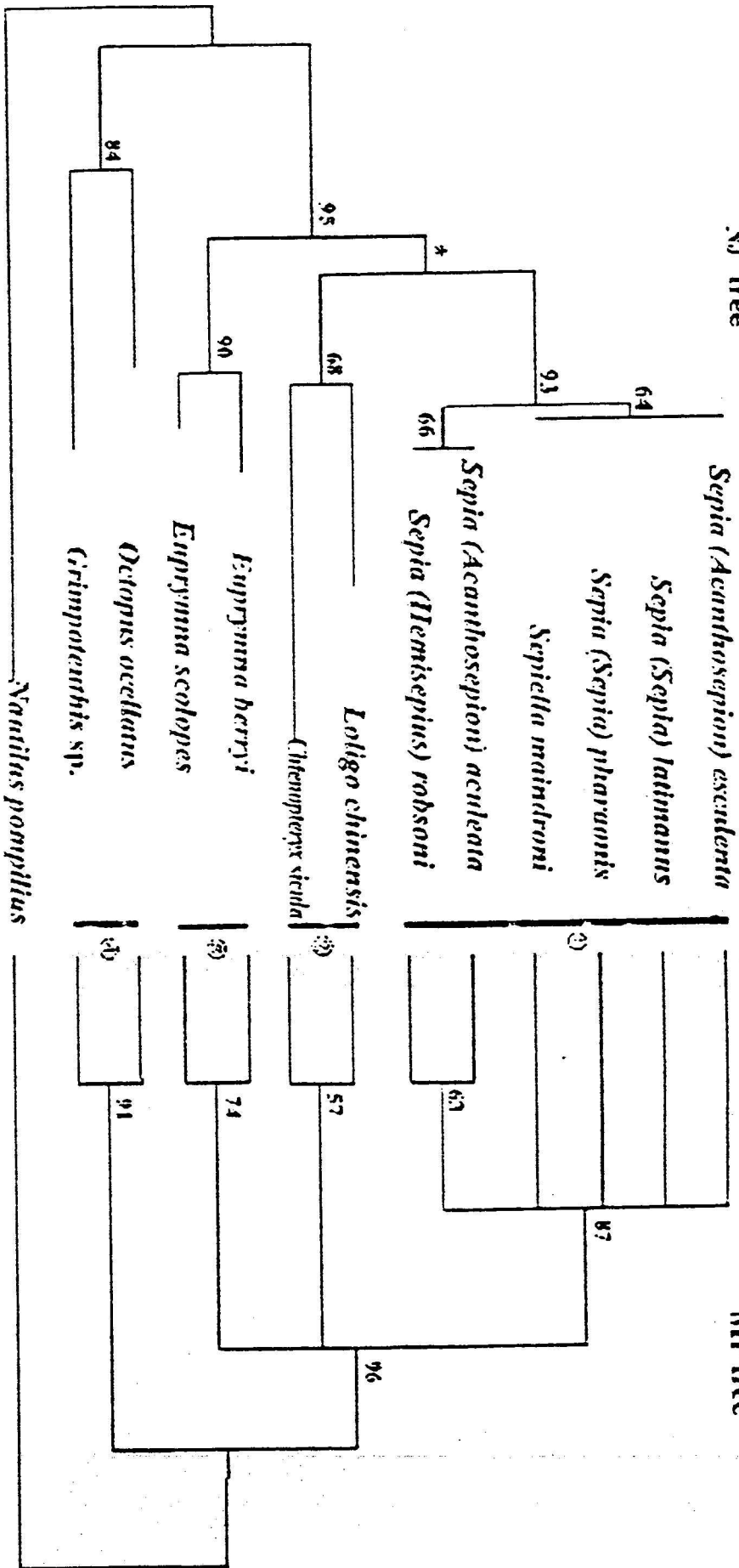
نزدیکترین تاکسون در رابطه با فاصله ژنتیکی *Sepia latimanus* و دورترین آنها *Sepia aculeate* بود. *Nautilus pompilius* متعلق به *Nautilida* دورترین گونه از سایر ۱۲ سرپایان تحت تجزیه و تحلیل بود. طبق سکوانس های آمینواسیدی، فاصله ژنتیکی در محدوده صفر تا ۰/۰۵۶ درون *Sepiida* یافت شد. *Sepiella maindroni* با سایر ماهیان مرکب گروه بندی شد حتی اگر متعلق به جنس متفاوتی در تاکسونومی سنتی بودند. دورترین فاصله بین *Nautilus pompilus* و سایر سرپایان (۰/۱۷۸ - ۰/۱۱۹) حاکی از این مطلب بود که رابطه بین آنها بسیار بعید بنظر می رسد. همچنین طول سکوانس های ژن *rRNA* ۱۷s در ۱۰ گونه در محدوده ۵۰۰ تا ۵۱۴ جفت باز بررسی شد.

در مورد *Sepiidae*، فاصله ژنتیکی ۵ گونه از *Sepia* در محدوده ۳۰ درصد تا ۴۵ درصد قرار داشت و کمی از این میزان در مورد *Sepiella* می باشد (۰/۰۷۷ - ۰/۰۵۹). فاصله بین *Sepiida*, *Sepiolidae* (۰/۰۰۹ ± ۰/۰۸۵) دارای تفاوت معنی داری از فاصله بین *Sepiidae*, *Teuthida* (۰/۰۱۳ ± ۰/۰۰۹) یا *Sepiolidae*, *Teuthida*

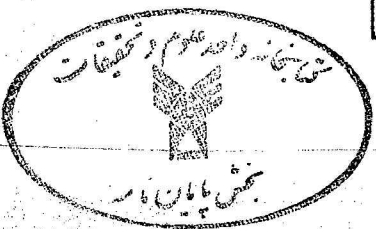
(۰/۰۱۲ ± ۰/۰۸۹) نبود. طولانی ترین فاصله (۰/۱۷۳) بین *Sepiolidae* (*Euprymna scolopes*) و *Octapod* (*Octopus variabilis*) دیده شد.

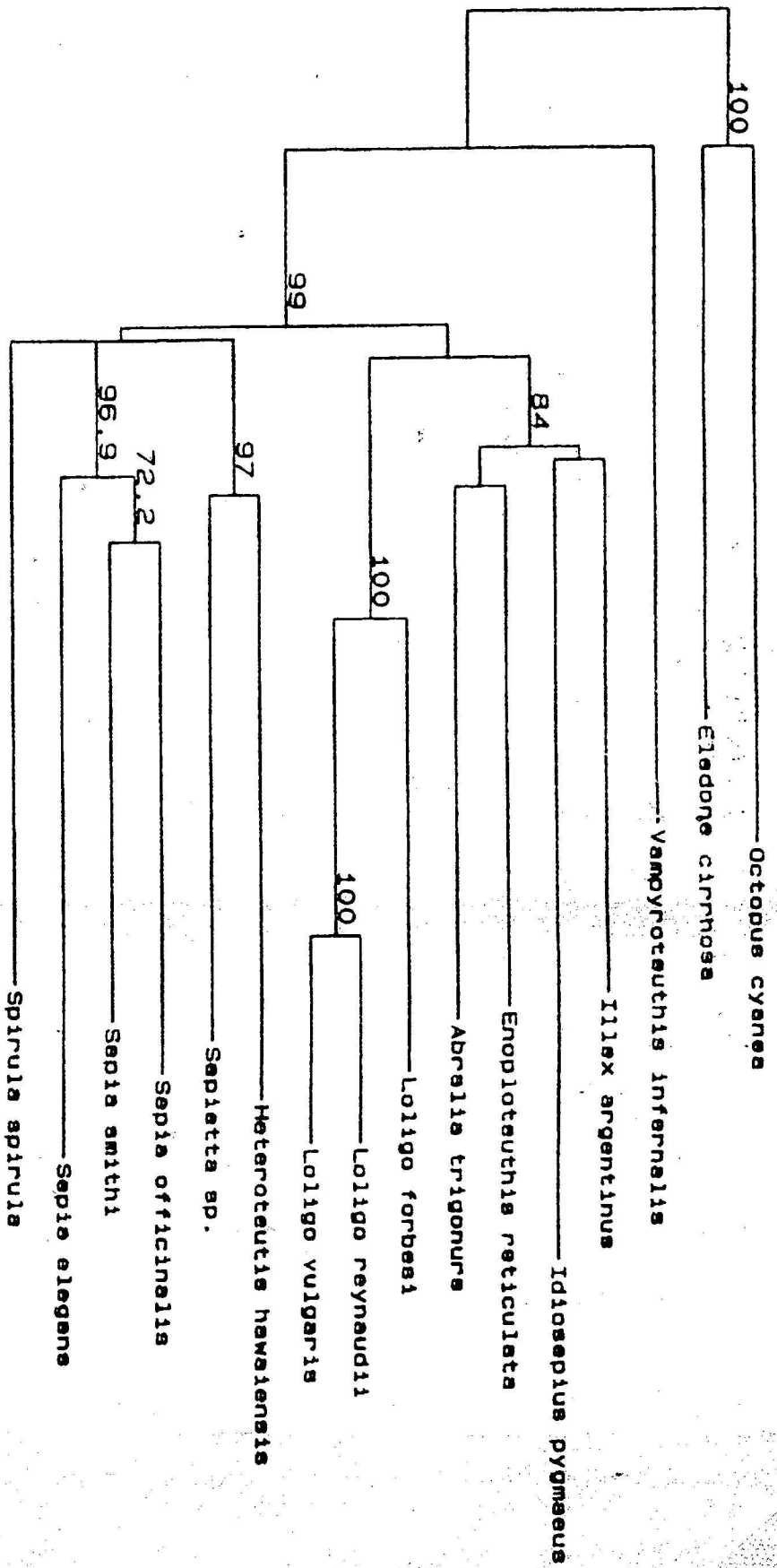
بر اساس تجزیه و تحلیل انجام شده ساختار توپولوژیک شجره های روابط خویشاوندی با استفاده از COI و سکوانس آمینواسید مشابه بود. صرف نظر از اینکه در مورد شجره های N.J یا M.P باشد. تک تباری *Sepiolidae* (N.J ۹۸٪، M.P ۷۸٪ (در شکل قبلی)، N.J ۹۰٪، M.P ۷۴٪ (در شکل صفحه بعد) و *Sepiidae* (N.J ۵۰٪، M.P ۵۸٪ (طبق شکل قبلی) و همچنین N.J ۹۳٪، M.P ۸۷٪ (طبق شکل قبلی) مورد تایید تحقیقاتی بود.

NJ tree



MP tree





بر اساس تجزیه و تحلیل های N.J ، Coleids به دو رده اصلی تقسیم می شوند: Octabrachia و Decabrachia (شامل: Sepiidae, Sepiolidae, Teuthida).

در مورد Decabrachia، ۶ گونه از خانواده Sepiidae همراه با ۲ گونه از راسته Teuthidae و سپس با خانواده Sepiolidae گروه بندی شدند (شجره های N.J در دو شکل قبلی).

تجزیه و تحلیل روش ایجاز (Parsimony) حاکی از آن است که Decabrachia به ۳ دسته موازی تقسیم گردید (M.P ۸۸٪ در اولین شجره و M.P ۹۶٪ در دومین شجره بیان گردیده است).

تجزیه و تحلیل روابط خویشاوندی بر اساس سکوانس ژن rRNA ۱۶S در شجره صفحه بعد نشان داده شده است. هر دو تجزیه و تحلیل M.P, N.J تک تباری سرپایان Coleids را اثبات میکند (M.P ۹۸٪ و N.J ۹۸٪). همچنین تک تباری خانواده Sepiidae (M.P ۶۴٪ و

N.J ۷۸٪) و خانواده Sepiolidae (M.P ۹۵٪ و N.J ۹۶٪) نیز به اثبات رسیده است.

در داخل Sepiolidae، Decabrachia در ارتباط نزدیکی با Teuthidae می باشد (M.P ۵۴٪ و N.J ۷۲٪).

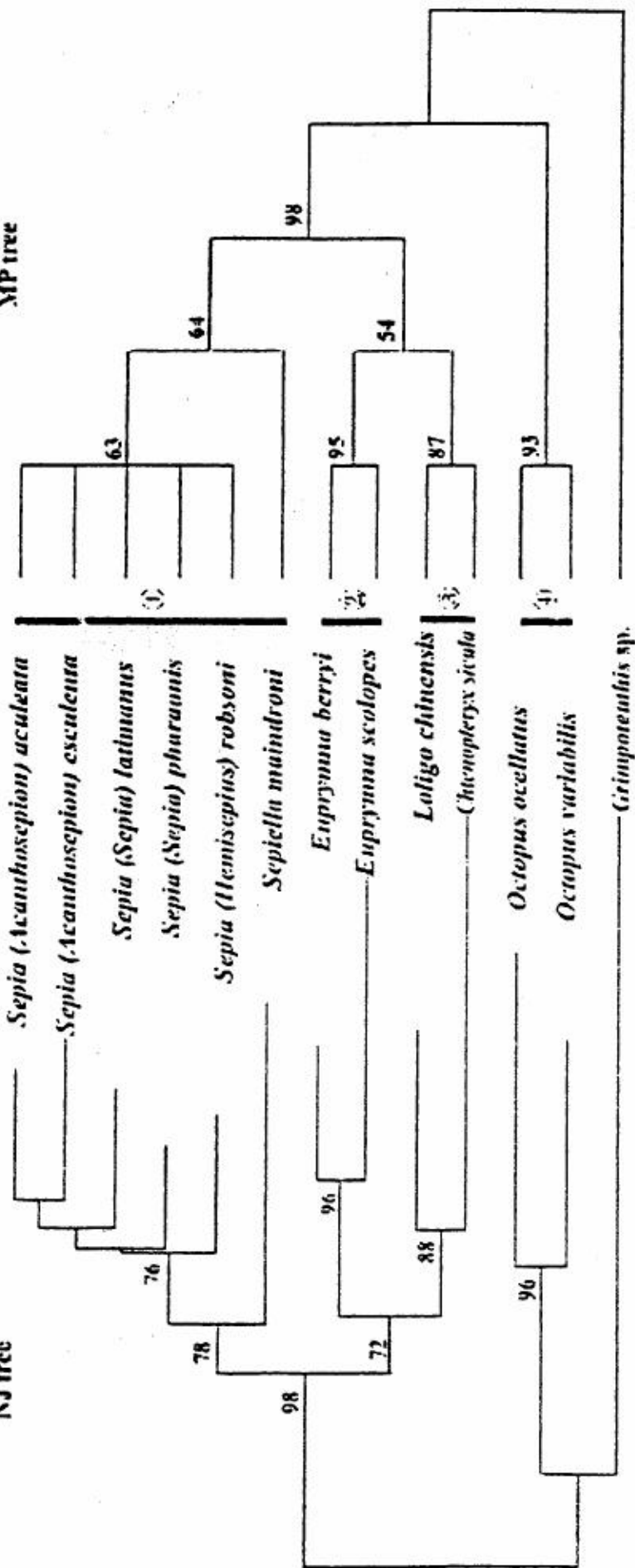
Sepiella, Sepia به طور واضحی از هم تفکیک شدند (M.P ۶۴٪ و N.J ۷۶٪) که این نشاندهنده آن است که آنها متعلق به دو جنس متفاوت هستند.

در شجره صفحه بعد، درخت روابط خویشاوندی N.J و درخت M.P بر اساس ژن rRNA ۱۶S را نشان می دهد:

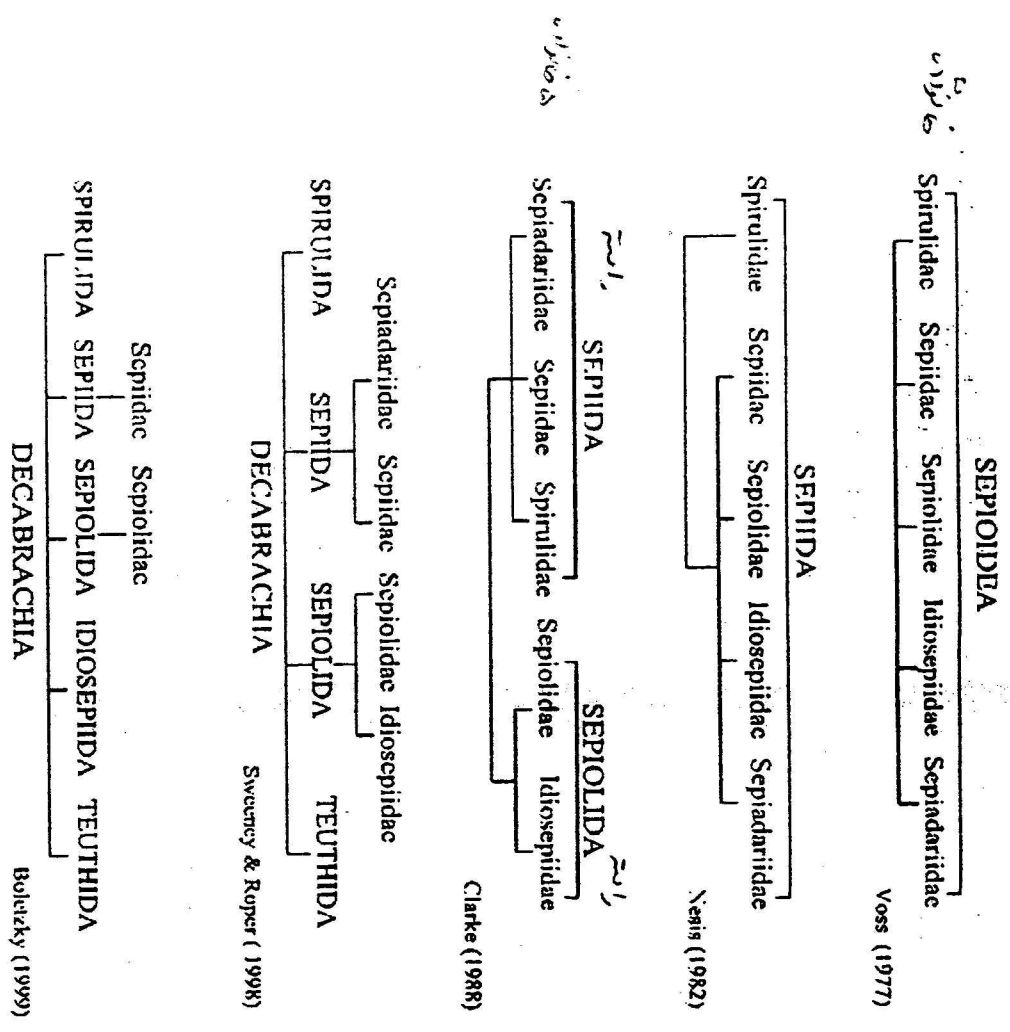


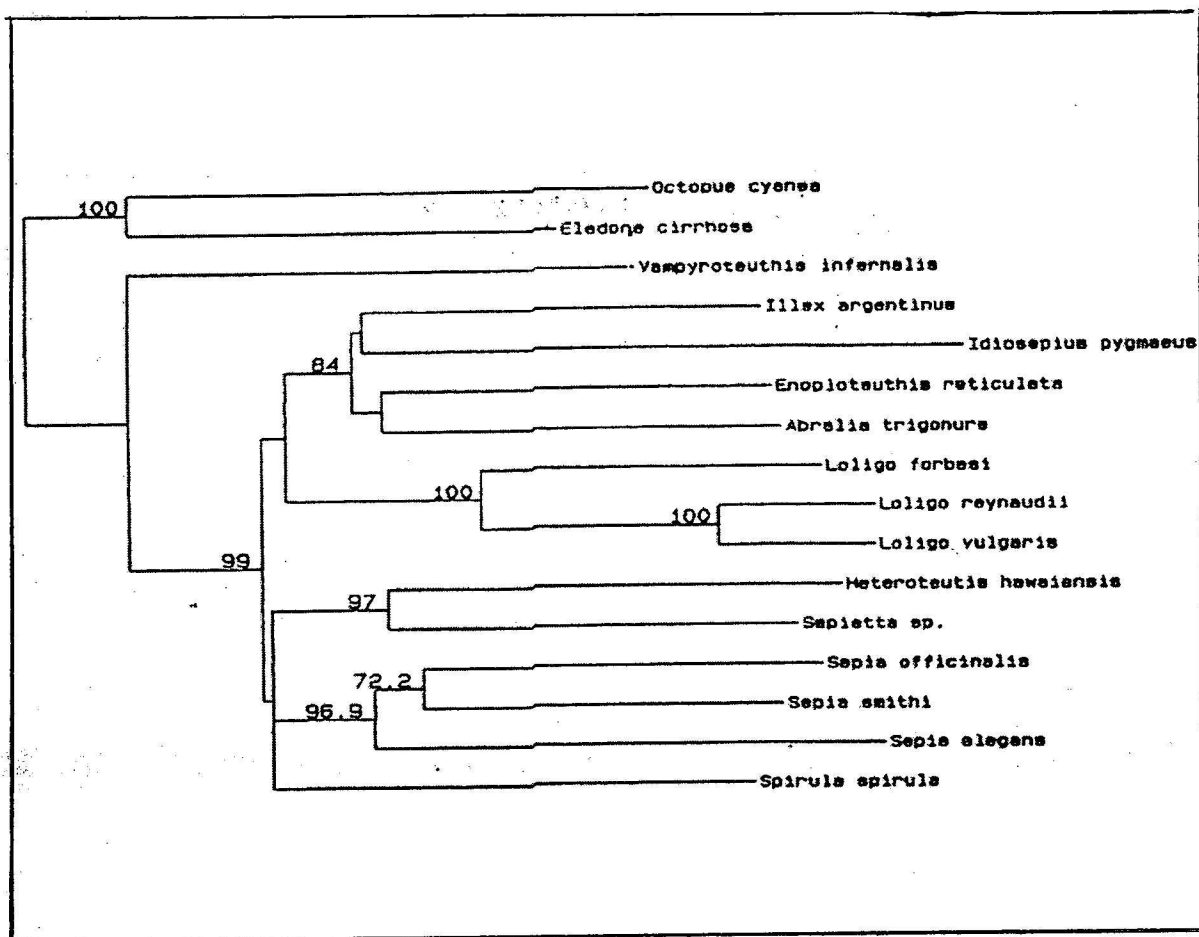
NJ tree

MP tree



شجره روابط خویشاوندی N.J و درخت M.P بر اساس ژن rRNA ۱۶s در شکل زیر آورده شده است:





پس از (Voss 1997) با شواهد دیرینشناسی و بررسی جانوران زنده روی زمین در زمینه سرپایان، Clark (1988) خاطر نشان ساخت که این 5 خانواده متعلق به 2 راسته متشکل از

Sepiidae, Spirulidae, Sepiadariidae می باشد و راسته Sepiolida متشکل از خانواده های Sepiolidae, Idiosepiidae می باشد.

Sweeney و همکارانش (۱۹۹۸) فهرستی از طبقه بندی مورد قبول امروزی از سرپایان راتپیه نموده و ابراز نمودند که این ۵ خانواده متعلق به ۳ راسته می باشد.

Boletzky (۱۹۹۹) اشاره می کند که این ۵ خانواده به ۴ راسته تعلق دارند و فوق راسته Decabrachia شامل ۵ راسته:

Teuthida, Idiosepiidae, Sepiida, Sepiolida, Spirulida می باشند.

Carlini و همکارانش (۱۹۹۹) خاطر نشان ساختند که Sepiolidae چندتباری (Polyphilitic) است. در تمامی شجره های روابط خویشاوندی، تک تباری (Sepiolidae, Sepiidae (monophyletic) به خوبی مورد تایید است (اما رتبه و موقعیت آنها درون (Decabrachia) روشن نیست).

در مجموع چنین می توان نتیجه گیری نمود که ۱۶s rRNA در سرپایان ابزار ارزشمندی برای تجزیه و تحلیل روابط خویشاوندی در سطح جنس محسوب می شود و ژن COI در سطح خانواده، مناسبتر به نظر می رسد.

Perez-Losada و همکاران (۲۰۰۲) جمعیت ماهی مرکب *Sepia officinalis* در شمال شرقی دریای آتلانتیک و دریای مدیترانه را از طریق تکنیک آلوزیم ها بررسی کردند. ۱۱ نمونه از ماهی مرکب *Sepia officinalis* در اطراف پنسیلوانیا، یک نمونه از جزیره کاناری (Canary) ایسلند، نمونه دیگر از Fiumicino (ایتالیا) برای ۳۳ جایگاه آلوزیمی غربال گردید. تنوع ژنتیکی در همه گونه ها حاکم بود (بین ۰/۲۲ و ۰/۰۷۶). روش های تشخیص بین نمونه های ایتالیایی با دیگر نمونه ها، احتمال وجود گونه ها یا زیرگونه های *sepia* که تاکنون تشخیص داده نشده اند را می دهد.

همچنین فرانک اندرسون (۲۰۰۰) در حال مطالعه ژنتیکی دو گونه *Uroteuthis duvauceli* و ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) در اقیانوس هند و اقیانوس آرام شرقی می باشد.

در این تحقیق از ژن ۱۸S rRNA استفاده گردید که دارای محل های اطلاعاتی مناسبی برای شناسایی ارتباط فیلوژنی بین گونه هایی است که از نظر مورفولوژی خیلی به هم نزدیک هستند لذا این ژن یک نشانگر قابل اعتماد و مناسبی برای مطالعات فیلوژنتیک محسوب می گردد

(Hansen and Loeschcke, ۱۹۹۶).

در این بررسی نشان داده شد که الگوی الکتروفورز هضم آنزیمی هریک از نمونه‌های ماهی مرکب (*S. Pharaonis*) آبهای خلیج فارس و دریای عمان با هر کدام از آنزیم‌های فوق یکسان می‌باشد و تنوع ژنتیکی در بین نمونه‌های بررسی شده مشاهده نمی‌شود. لذا انجام هرگونه آنالیز آماری برای محاسبه تنوع ژنتیکی و سایر فاکتورهای ژنتیکی امکان‌پذیر نبوده است. با نتیجه‌ای که از این تحقیق بدست آمد می‌توان ادعا نمود که نمونه‌های آنالیز شده ماهی مرکب (*S. pharaonis*) از مناطق مختلف خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از ژن ریپوزومال RNA احتمالاً مربوط به یک جمعیت بوده و در ژن ۱۸S rRNA با هم شباهت دارند.

در این بررسی هیچ نشانی از وجود پدیده هتروپلاسمی یک فرد هم مشاهده نگردیده است و احتمالاً این ژن در تمایز بین گونه‌ای کارایی بیشتری در مقایسه با تمایز جمعیت‌ها داشته باشد.

- ۱- از نواحی دیگر ژنوم میتوکندری مانند ناحیه D-Loop یا ND۵/۶ یا از کل ژنوم جهت طراحی مارکر جمعیتی استفاده نمود تا نتایج حاصله با نتایج قبلی بدست آمده مقایسه شده و عدم وجود تنوع نوکلئوتیدی و ژنوتیپی بدست آمده از طریق بررسی یک ژن کاملاً به اثبات رسد. این امر مسلماً در تعیین قطعی پلی مورفیسم جمعیتی یا عدم وجود آن مؤثر خواهد بود.
 - ۲- آنالیز RFLP با بکارگیری تعداد بیشتری آنزیم اندونوکلاز محدود کننده روی رشته DNA صورت گیرد تا بتوان با اطمینان بیشتری نسبت به عدم چند شکلی با استفاده از ژن ۱۸S rRNA اظهارنظر نمود.
 - ۳- همچنین می توان برای اثبات تعلق این نمونه ها به یک جمعیت واحد از نشانگرهای دیگری نظیر AFLP , SSR و همچنین از سایر ژنهای مستقر در mt DNA استفاده نمود.
- امید است که با پیشرفت روشهای ژنتیکی جدید برای شناسایی کارآمد، وجود تمایز نه فقط در میان گونه ها، بلکه در میان جمعیتها و ذخایر محلی مشخص گردد.

ضمیمه

STE

NaCl ۱۰۰mM

Tris – Hcl ۱۰ mM

EDTA ۱mM

حجم را به یک لیتر رسانده و pH را روی ۸ تنظیم می کنند.

TE (pH = ۷,۵)

Tris Base ۱۰ mM

EDTA ۱ mM

TAE (۱۰×) (pH= ۸,۵)

Tris Base ۰/۴ M

Na – Acette ۰/۲ M

EDTA ۰/۰۲ M

NaCl ۰/۱۸ M

TBE (۱۰ ×)

Tris – Borate (۱۰۸ گرم)

Boric Acid (۵۵ گرم)

EDTA (۷/۵ گرم)

مواد فوق را با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده و pH محلول را به ۸ رسانده، سپس جهت بافر دستگاه الکتروفورز غلظت محلول TBE را ابتدا (۱X) رسانده (۱۰:۱ رقیق می‌شود) و در داخل دستگاه می‌ریزند. ولی برای ساخت ژل پلی اکریل آمید با همان غلظت (۱۰x) استفاده می‌گردد.

محلول فنل

این ماده در بازار بصورت کریستال موجود می‌باشد و جهت استفاد از آن در آزمایشگاه باید آنرا بصورت بافر درآورد. این عمل با استفاده از مواد و طی مراحل ذکر شده به شرح ذیل می‌باشد.

مواد:

۱- ۸- هیدروکسی کینولین (8-Hydroxy quinolin)

۲- فنل محلول شده

۳- تریس بار (50 mM) با $\text{pH}=10.5$

۴- تریس HCl (mM) با $\text{pH}=8$

روش:

۱- در یک بشر دولتری به میزان یک درصد میزان فنل موردنظر جهت اشباع سازی ۸- هیدروکسی

کینولین اضافه می‌شود.

۲- سپس به آرامی مقدار ۵۰۰ میلی لیتر فنل مایع شده یا کریستال‌های ذوب شده یا فنل غیراشباع افزوده

می‌شود (ذوب شده در یک حمام آبی در ۶۵ درجه سانتیگراد). ۸- هیدروکسی کینولین رنگ زرد به

محلول می‌دهد و به عنوان یک آنتی اکسیدان اضافه می‌شود.

۳- سپس ۵۰۰ میلی لیتر از تریس باز (50 mM) افزوده می‌گردد.

۴- به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت پائین با مگنت در دمای اتاق همزده می‌شود. درضمن روی ظرف

شیشه‌ای را باید با فویل آلومینیومی پوشاند.

۵- به محلول اجازه داده می‌شود تا در دمای اتاق، فازها جدا شوند.

۶- به آرامی فاز بالایی را به داخل ظرف دیگر منتقل نموده و جهت حذف آنچه از فاز بالا نمی‌توان خالی

کرد با یک پیپت شیشه‌ای ۲۵ میلی لیتر و یک دستگاه مکند آنرا جدا می‌کنند.

۷- ۵۰۰ میلی لیتر از Tris-HCl ($\text{pH}=8$) افزوده می‌شود.

۸- مراحل چهارم تا هفتم را تکرار نموده و pH فاز فنل را می‌توان توسط اندیکاتور کاغذی کنترل کرد. چنانچه pH آن برابر با ۸ یا بالاتر باشد، محلول مناسب است و در صورت پائین بودن pH مراحل سوم تا هفتم باید تکرار شود.

۹- در نهایت ۲۵۰ میلی‌لیتر Tris-HcL یا بافر TE به فنل اضافه می‌شود و در بطری شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ یا بطری شفاف که با فویل آلومینیومی پوشیده شده، آنرا نگهداری می‌کنند. مدت نگهداری فنل، دو ماه می‌باشد.

محلول استات سدیم ۰/۳ مولار

در ابتدا پودر استات سدیم در آب مقطر حل نموده و سپس pH آنرا بوسیله اسید استیک به ۵/۲ می‌رسانند.

(۱۰X) PCR Buffer

این بافر، شامل اجزای زیر می‌باشد:

(۱۰۰ میلی مولار با pH = ۸/۳) Tris - HcL - کلرید پتاسیم (۵ میلی مولار) - کلرید منیزیم (۱۵ میلی مولار) ژلاتین (۱۰ درصد)

- آمونیوم پر سولفات (A,P.S) (Ammoniom per sulphate)

این ماده به صورت پودر خشک می‌باشد که ۱۰ گرم از آنرا به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانند تا ۱۰٪ A.P.S داشته باشند.

TEMED-

این ماده به صورت محلول بوده و بسیار فرار و سمی می‌باشد. این ماده خاصیت کاتالیزوری جهت تسریع در پلیمریزاسیون ژل پلی‌اکریل آمید را دارا می‌باشد.

- پلی اکریل آمید ۳۰٪ (Polyacrylamide)

این محلول از حل کردن ۲۹ گرم آکریل آمید به همراه ۱ گرم متیلن بیس آکریل آمید (N, N'-methylenebisacrylamide) در ۷۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه می شود سپس آنرا در جای تاریک و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگه می دارند. قابل ذکر است که آکریل آمید سمی است و از طریق پوست نیز جذب می شود. لذا جهت کار با این محلول همیشه باید از دستکش و ماسک استفاده شود.

فهرست منابع فارسی

- ۱- اسدی، ف. (۱۳۸۰). تنوع ژنتیکی و ساختار آن در درون و بین جوامع گیاهی از گونه‌های مختلف صنوبر و تلاقی پذیری بین ارقام بومی و غیربومی آن. رساله دوره دکتری رشته جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، ۲۴۱ ص.
- ۲- امتیازی، گیتی، کریمی، محسن. ۱۳۸۰. مبانی زیست مولکولی و مهندسی ژنتیک. انتشارات مانی، چاپ سوم. ص ۵۳-۱۷.
- ۳- امین لاری، محمود، ۱۳۷۸. پیش‌درآمدی بر مهندسی ژنتیک. ترجمه مهندسی ژنتیک دانشگاه شیراز. ۳۶ صفحه.
- ۴- بیوتکنولوژی مولکولی، ترجمه مجتبی طباطبایی، محمدرضا نوری دلویی، چنگیز تقی بیگلو. ۱۳۷۲. انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی. صفحات ۴۵-۸۳.
- ۵- بیولوژی سلولی و بیولوژی مولکولی، نورزاد، غلامرضا، ۱۳۸۱. مؤسسه انتشاراتی نوردانش. صفحات ۲۱۴-۲۳۹.
- ۶- بیوتکنولوژی مولکولی، اصولی و کاربرد DNA نو ترکیب، ترجمه جواد بهروان. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد. ۱۳۸۲. ۳۶۸ صفحه.
- ۷- بیولوژی سلولی و مولکولی، نصیری، حبیب، ۱۳۸۳. انتشارات کتاب. صفحات ۱۸۰-۸۶.
- ۸- تجلی پور، م. ۱۳۶۴. کالبدگشایی و تشریح جانوران. جلد اول (بی‌مهره‌گان). ص ۲۳۰-۲۰۶.
- ۹- دهقانی پشترودی، رضا و اسدی، هدایت. ۱۳۷۵. اطلس ماهیان خلیج فارس و دریای عمان. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۴۳ صفحه.
- ۱۰- رضوانی، س.ع سیدعلی بابایی، س.ع. پورکاظمی، م. ۱۳۸۰. بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) در دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) I به روش RFLP. شماره ۲، سال دهم. بولتن علمی شیلات ایران. صفحات ۱۵ تا ۱۹.
- ۱۱- زیست شناسی سلولی و مولکولی، محمودرضا رفیعی، حامد باستین، شهاب ابطحی، امیر مسعود صادق بیگی - محمد فلاحی. انتشارات کتاب. ۶۰۷ صفحه.

- ۱۲- سیدعلی بابایی، سیدعلی. ۱۳۸۰، بررسی مولکولی جمعیت میگوهای *P. indicus* و *P. semisculcatus merguiensis* دریای عمان و خلیج فارس به روش RFLP بر مولکول mt DNA. پایان نامه دکترای دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی ص ۷۲-۷۰.
- ۱۳- سید علی بابایی، سیدعلی. ۱۳۸۱. بررسی جمعیت میگوی سفید هندی شرق و غرب جاسک به روش ژنتیکی. گزارش نهایی پروژه مرکز تحقیقات شیلاتی دریای عمان. ۱۰۲ صفحه.
- ۱۴- شجاعی کاوان، لیدا، ۱۳۸۲. بررسی ژنتیکی جمعیت میگوی سفید (*Metapeneuse affinis*) خلیج فارس و دریای عمان به روش PCR-RFLP بر روی مولکول mt DNA. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم و فنون دریایی ۹۶ صفحه.
- ۱۵- شیخ اسلامی، مریم. ۱۳۷۸. بررسی توکسوپلاسموزیس در مبتلایان به نقص ایمنی با دو روش PCR و IFA. پایان نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۹۰ صفحه.
- ۱۶- شینی ماندنی، پیمان. ۱۳۷۳. بررسی آلودگی عضلات کفشک ماهی، پایان نامه دوره دکتری عمومی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. ص ۳۲-۲۱.
- ۱۷- کردوانی، پرویز. ۱۳۷۴. اکوسیستم‌های آبی ایران (خلیج فارس و دریای عمان) ص ۲۵-۱۸.
- ۱۸- عطایی، فریبا. ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی تا سمای ایرانی (*Acipenser persicus*) در رودخانه سفیدرود با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP روی mtDNA و اطلاعات مورفولوژیکی، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم، ۱۵۷ صفحه.
- ۱۹- فسیحی هرنندی، الف، اشرفی، ح. و عبدمیشانی، س.، ۱۳۸۴. روش RAPD-PCR به عنوان مارکر DNA در ژنتیک و اصلاح نباتات. مجله پژوهش و سازندگی (۲۹)، ۶۰۵۶.
- ۲۰- لالویی، فرامرز، ۱۳۸۲. بررسی مولکولی جمعیت ماهی *Barbus capito* در آبهای حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۱، سال دوازدهم، بهار ۱۳۸، ۱۴ صفحه.
- ۲۱- محمدی کاشانی، قاسم. ۱۳۸۱. مطالعه جمعیتی شاه میگوی گونه *Panulirus homarus* با استفاده از آنالیزهای عددی و مولکولی، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران، دانشکده علوم، ۱۰۸ صفحه.

- ۲۲- محمدی، علی اکبر، پيله چيان لنگرودی، رضا، چايچی، وحيد. ترجمه نگرش برژن، انتشارات مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی. ۱۳۷۷. صفحات ۲۰۱-۲۳۳.
- ۲۳- نوری نژاد، م و نیامیندی، ن. ۱۳۷۲. بیولوژی و مدیریت صید ماهی مرکب. مرکز تحقیقات شیلاتی بندرعباس. ۹۳ صفحه.
- ۲۴- بلگواده، و لوبتین، ب ، ۱۳۸۱. ماهیان خلیج فارس. ترجمه: بابا مخیر و اسماعیل اعتماد. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، چاپ سوم، ۴۲۲ صفحه.
- ۲۵- نوری نژاد، م . ۱۳۷۴. آزادسازی و ممنوعیت صید ماهی مرکب. مرکز تحقیقات شیلاتی بندرعباس. ۷۱ صفحه.
- ۲۶- ولی نسب، تورج. ۱۳۷۲. گزارش نهایی پروژه بررسی بیولوژی ماهی مرکب و شناسایی گونه‌ای سرپایان. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۲۳ صفحه.
- ۲۷- ولی نسب، تورج. ۱۳۷۸. بررسی تنوع جمعیتی ماهی مرکب بیری (*Sepia pharaonis*) در آبهای خلیج فارس و دریای عمان. رساله دوره دکتری (Ph.D) دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات. ۱۷۳ صفحه.

References:

- 1-Allcock, A.L. and S.B. Piertney. 2002. Evolutionary relationships of southern ocean Octopodidae (Cephalopoda: Octopoda) and a new diagnosis of Pareledone . Mar.Bio.140: 129-135.
- 2- Anderson, F.E. 1999 . Phylogeny and historical biogeography of the Loliginid squids (Mollusca: Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data. Mol. Phylogen . Evol. Vol. 15, no.2. PP. 191-214.
- 3- Anderson , F.E. 2000. Phylogentic relationships among loliginid squids (Cephalopoda: Myopsida) based on analyses of multiple data sets. Zoo. J. Linnean. Soci. Vol. 130, PP. 603-633.
- 4- Avis, J.C; and landsman, R.A. 1983. Polymorphism of Mitochondrial DNA in population of higher animal, 143-172pp. In : Evolution of Genes and proteins, M.Nei and R.K. Koehn, Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- 5- Avis, J.C; Bermingham, E.;Kessler,G.and Sanders, N.C. 1984. Characterisation of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) Evolution vol.38, pp.q31-q41.
- 6- Badaracco, G.,Bellorini, M.,Landsberger,N. 1998. Phylogenetic study of Cephalopoda-Journal of –molecular evolution. 42:152.
- 7- Bandel , T. and T. Engeser 1998. Phylogentic analysis and systematization of the Cephalopoda (Mollusca).Verh. Natruwiss. Ver Hamburg . 24: 187-220.
- 8- Bermingham, E.; Forbes, S.H.; Friedland , k. and Pla, C., 1991 . Discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of North American and European origin using restriction analysis of mtDNA. Can. J.Fish Aquat. Sci.vol. 48, No.5, pp.884-893.

- 9- Bernened sue Ann., 2000. Identification of uniparental disomy following parental detection of robertsonian translocations and isochromosomes Am J Hum Genet. 66: 1787-1795.
- 10- Bentzen, p. ; Leggett, w.c.; Brown, G.G. 1988. Length and restriction site (Alosa sapidissima) Genetics, 118: 503-517
- 11- Boletzky, s.v.1999. A brief out line of the classification of recent Cephalopods Bull. Soc Zool.fr.124(3) : 271-278.
- 12-Bonnaud, L.R.Boucher-Rodoni & M.Monnerot . 1994. Phylogeny of decapod cephalopods based on partial 16s rDNA nucleotide sequences. C.R.Acad .Sci.317(6): 581-588.
- 13-Bonnaud, L., R.Boucher-Rodoni & M.Monnerot . 1996. Relationship of some coleoid cephalopods established by 3' end of the 16s rDNA and cytochrome oxidase III gane sequence comparison. Am . Malacol. Bull. 12:87-90.Phylogent. Evol.7(1):44-54.
- 14-Bonnaud, L.R.Boucher-Rodoni & M.Monnerot .1997. phylogeny of cephalopods in ferred from mitochondrial DNA sequences. Mol. 11: 34-49.
- 15-Brown, W.M., Gerge, M.J;Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of mitochondrial DNA . Proc . Natl.Acad. Sci. USA 76: 1963-1972.
- 16- Brown, W.M.1981. Mechanisms of evolution in animal mitochondrial DNA .Ann. N.Y.Acad .Sci.361: 114-129.
- 17-Brown, W.M.1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. In Evolution of genes and proteins (Nei, M. and koehn, R. K.Edn), Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. 57-930 pp.
- 18-Brown, T.A.1989. Genetics; a molecular approach Iondon: Van Nostrand Reinhold (International). 133-149pp.

- 19- Carlini, D.B. and Graves, J.E. and kuzniar, P.A 1999. Phylogenetic analysis of 18s rRNA sequences to determine high-level relationships Cephalopods; Bull.Mar, Sci. 64(1)57-78.
- 20- Carlini , D.B.; kimberly, S.; Graves, J.E. 2000. Actin gene family evolution and the phylogeny of Coleoid Cephalopods (Mollusca: Cephalopoda). Mol. Bio. Evol. Vol. 17, PP. 135-1370.
- 21-Carlini, D.B. and J.E.Graves. 2001. A molecular phylogeny of the Octopoda (Mollusca: Cephalopoda) evaluated in light of morphological evidence. Mol. Phylogenet. EVO.21: 388-397.
- 22- Carmignance, D.F.Rovinson, I.C.F.Enberg, B.Norstedt, G. 1998. Growth hormone receptor regulation in growth hormone deficient dwarf rats. Journal of Endocrin, 138: 267-214.
- 23- Chang, Y.S.; Huang, F.L.and Lo, T.B., 1994. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprion carpio*) mitochondrial genome. J.Mol. Evol. Vol. 38, No. 2, PP. 138-155.
- 24- Chapman, R.W., and Powers, D.A. 1984. A method for the rapid isolation of mitochondrial DNA from fishes. Technical Report No. um SG-Ts 84-05. Maryland seagrass program, College park, Md.
- 25- Chow, S. and Inoue , S. 1993. Intra- and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of Thunnus tuna species. Bull. Nat.Res. insst. Far Seas Fish. 30:207-225.
- 26- Clark-walker, G.D.1985. Basis of diversity in mitochondrial DNAs In: the Evolution of Genome size , edited by T.Cavalier –Smith . New York: wihey, pp.269-293.
- 27- Clark, M.R.1998. Evolution of recent Cephalopods-A brief review. In: F.W.Harrison & A.g.Kohn, the mollusca, vol.12. Paleontology and neontology of Cephalopods. San Diego: Academic Press. PP.331-340.

- 28- Cohen, B.L. 1999. Brachiopod molecular phylogeny advances. Heredity, Vol. 6. PP.: 132-157.
- 29- Copper, G.M. 1997. The cell. A molecular approach (Book). ASM press. P.114-32-Cronin, M.A., Sperman, w.y.wilmot, R.L.;, 1993. Mitochondrial DNA variation in chinok (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O.keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction products. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50: 708-715.
- 30- Cronin, M.A.; Hilis, S.; Potton, J.C. 1994. mt DNA variation in Atlantic and Pacific Walrus. Can. J. Zool. 72: 1035-1044.
- 31- Dong, z.z. 1998. Biology of the economic species of cephalopods in the world oceans. Jinan: Shandong science and technology Press. Pp. 197-236.
- 32- Edward, C.A. 1989. Studies of mitochondrial DNA variation in mussels. Ph.D thesis. University college swan sea. 83-98pp.
- 33- ENDO, K. 2001. The phylogenetic position of Brachiopods inferred from mitochondrial gene orders. Heredity, Vol. 12 PP. 73-84.
- 34- FAO. 1984. FAO species identification sheets for fishery purposes. Fishing area 51. Rome.
- 35- Gjetva j, B., Cook, D.I. and Zovros, E. 1992. Repeated sequences and large scale variation of mitochondrial DNA : a common feature among Scallop (Bivalvia: Pectinidae). Mol. Biol. Vol. 9: 104-133.
- 36- Gold, J.R.; Kristmundsdottir, A.Y.; Richardson, L.R. 1997. Mitochondrial DNA variation in king Mackerel (*Scomberomorus cavalla*) from the western Atlantic ocean and Gulf of Mexico. Mar. Biol., 129: 219-230.

37- Gray, John, S. 1997. Marine Biodiversity : Patterns, threats and conservation needs , GESAMP. Pp.132-145.

38-Hall, H.J. and Nawroocki, L.N. 1995. A rapid method for detecting mitochondrial DNA variation in the brown trout . J. of Fish Biology. 46: 360-364.

39- Hansen, M.M and Loeschke, V.1996. Genetic differentiation among Danish brown trout population as detected by RFLP amplified mt DNA segments. Journal of fish Bio . 422-439.

40-Harrison, R.G. 1997. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology . Trends Ecol.Evo. 4: 6-18.

41-Hillis, D.M . and Moritz, c.,1990. Molecular Taxonomy. Sinauer associatetets, Inc.Publisher. Massachsetts. U.S.A.

42-Johansen, S.; Berg, T.and Moum, T., 1994. Variability and evolution of mitochondrial DNA sequence from marine animals. In: Third international Marine Biotechnology conference, Tromso, Norway , 133p.

43-karp. H. Lssac, P.G. Ingram. D.S. 1998. Molecular tools for screening biodiversity chapman & hall press, pp: 111-119.

44- Kondo, R.; Satta, Y.; Matsuura, E.T.; Ishiwa , H.; Takahata, N.; Chigusa, S.I. 1990. Uncomplete metenal transmission of mitochondrial DNA in Drosophila. Genetics 126: 666-674.

45- Lee, F.x. 1983. Study on cephalopod fauna in taiwan strait . J. Oceanography in Taiwan Strait 1: 103-107.

46- Lewin, B. 1994. Gene V.Oxford university press. New Yok erg.

47- Lu, C.C. 1998. Diversity of Cephalopoda from the waters around Taiwan. Phuket Marine Biological center Special Pubication 18 (2) : 331-340.

- 48- Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes . In: Biochemistry and Molecular Biology of fishes , 2 molecular biology frontiers. Ed. Hochachka pp. 1-33.
- 49-Moritz, C., Dowling, T.E and Brown, W.M. 1987 . Evolution of animal mitochondrial DNA : relevance for population biology and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 267-299.
- 50- Nesis and N.kir . 1982. Cephalopods of the world . Moscow: Light and Food Industry Publishing House (English translation , 1997). NJ:F.H Publications, Inc., Ltd . pp.93-147.
- 51-Newton, C.R. & Graham, A. 1997. PCR. Second Editin . Bioscientific Press PP.9-25.
- 52-Nicholas, K.B., H.B. Jr . Nicholas & D.W.Deerfield. 1997. Gene doc : analysis and visualization of genetic variation, EMBNEW. NEWS 4: 140.
- 53-Ovenden, J.R.; Booth, J.D.; Smolenski, A.J. 1996. Mitochondrial DNA phylogeny of red and green rock lobsters (genus *Jasus*) Mar. Fresh water. Res., 48: 1129-1135.
- 54-Ovenden, J.R.; Brasher, D.J. and white R.W.G. , 1997. Mitochondrial DNA analysis of the red rock Lobster (*Jasus edwardsii*) an apperent absence of population subdivision throughout Australia . Mar.Biol., Vol. 112, No. 31, pp. 114-138.
- 55-Pastene, L.A.; Goto, M.; kato, H. 1997. Intra- and interocenic Patlerns of Mitochondrial DNA variation in the Bryde's whale, *Balaenoptera edeni* Rep. Int. whal. Commn 47.
- 56- Pawlowski, J.; Montoya-Burgos, J.; Fahrni J. 1996. Origine of the Mesozoa from 18S rRNA Gene Sequences. Mol. Biol. Evol. 13 (8): 1128-1132.

- 57-Perez – Losada, A Guerra, G R Carvalho, 2002. Extensive populatin subdivision of the Cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca :Cephalopoda) around the Iberian Peninsula indicated by
- 58- Piertney, S.B., C.Hudelot, F.G.Hochberg & M.A.Collins. 2003. Phlogentic relationships among cirrate octopods (Mollusca: Cephalopoda) resolved using mitochondrial 16 S ribosomal DNA sequences. Mol. Phylogenet Evol. 27: 348-353.
- 59- Pourkazemi, M., 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the Caspian sea. Ph.D. thesis, school of Biological Sciences, University wales, Swansea. 26.p.
- 60- Rezvani Gilkolaei, S., 1999 . Polymerase chain reaction (PCR) addirect sequence of mt DNA from the ND 5/6 gene region in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) from the southern Caspian Sea. Iranian Journal of fisheries Sciences. Vol.1, NO. 1, PP.24-34
- 61- Rezvani Gilkolaei, S.,2000 . Study of mt DNA Variation of Russian sturgeon population from southern Caspian sea using RFLP analysis of PCR amplified ND 5/6 gene regions. Iranian Journal of Fisheries sciences. Vol. 2 , No. 1, pp.13-36.
- 62- Sharp. P. A. (1987). Current protocols in molecular biology. PP. : 205-1.
- 63- Snyder, M., Fraser, J.Iiaroche, K.E., Kepkay, G. and Zouros, E. 1987. A typical mitochondrial DNA from the deep sea scallop *placopecten magellanicus* proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1496- 1508.
- 64- Strugnell, J. 2000. Phylogeny, rates of evolution and estimating divergence time events in Cephalopod Mollusca Heredity. Vol. 8, PP. 39-52.

65-Sweeney, M.J. and C.F.E.Roper . 1999. Classification, type Localities, and type repositories of recent Cephalopoda. Smithsonian Contributions to zoology 586:561-599.

66- Syvanen, M. 2002. Rates of ribosomal RNA evolution are uniquely accelerated in eukaryotes. J.Mol. Evol. Vol. 12, PP. 37-49.

67- Taggart, J.B., Hynes, R.A., 1998. A simplified protocol for Routine total DNA Isolation from fishes. Journal of fish biology. 42, 628-639.

68- Vpholt, W.B.; Dawid, I.B. 1977. Mapping of mitochondrial DNA of individual Utter , F.M.J.Fish.. Biol.39: 1-38.

69- Voss, G.L. 1977 . Present status and new trends in cephalopod systematics. In : M. Nixon & J.B. Messenger, editors. The biology of cephalopods. Symposium of the zoological society of london. London: Academic Press. Vol. 38:49-60.

70- Warnke, R., Saint-Paul, K.' Blohm, U.2000. Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae). Marine biology. V.136, no. 1.P. 29-35.

71- Warnke, K.' Plotner, J.' Santana, I.' Rueda, M.J.& Liinas, O.2003. Reflections on the phylogenetic position of *spirula* (Cephalopoda): Preliminary evidence from the 18S ribosomal RNA gene. Berliner Palaobiol. Abh. Vol.3, pp. 253-260.

72- Warrior, R. and Gall, J. 1995. The mitochondrial DNA of *Hydra attenuate* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules. Arch-Sc. Geneve. 3: 437-449.

73- Whitmore, D.H. 1990. Electrophoretic And Isoelectrofocusing Techniques In Fisheries Management, PCR Press, INC.

74-Wilding, C. S., 1997. Mitochondrial DNA variation in the Scallop *Pecten maximus*. assessed by a PCR-RFLP method, Heridity, 79:178-190.

75-Willson, A.C.; Cann, S.M.; George, M.; Gyllensten, U.B.; HelmBychowsh, k.M.; Higuchi, G.; Palunbie, S.R.; Prager, E.M.; Sage, R.D and Stoneking, M., 1997. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol. Y.Linn. Soc.vol. 26, pp.375-400.

76- wink, M.; Heidrich , P.; Fentzloff, C. 1996. A mt DNA phylogeny of sea Eagles (*genus Haliaeetis*) based on nucleotide sequences of the cytochrom b-gene Biochem. Sys. Ecol . , 24(8) : 779- 789.

77-Winnepenninckx, B., T.Backeljau and R.De wachter. 1998. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. Trends Genet 9: 407.

78-wright, s., 1987. Evolution and the Genetic of population vol. 3.Experimental results and Evolutionary Deductions. The university of chicago press. Chicago, Il. 613 pp.

79- Young, J.Z. 1981. The life of vertebrates. Thirdded . Clarendon Press. Oxford. pp.132-156.

80- zheng, X.D., Y.Natsukari,R.C. Wang, Z.P. Wang and Y.Li. 2001a. Biochemical genetic studies on the Cuttlefish *sepia maindroni* (Cephalopoda, Sepiidae)-active loci screening of isozyme. Chin. J.Oceanol Limnol. 19(4):345-355.

81- Zheng, X.D., R.C. Wang, X.F.Wang, X.Shu and B. Chen. 2001 b. Genetic Variation in Populations of the common Chinese Cuttlefish *Sepiella mandronin* (Mollusca: Cephalopoda) using llozymes and mitochondrial DNA sequence analysis . J.shell fish Res. 20: 1159-1165.
microsatellite DNA variation. Heredity. 84, PP. 417-424.

82- Zheng, X.D., J.M.Zhao, X.Shu, R.C.Wang, S.D.Wang & W.Zhou. 2004. Isozymes Analysis of the Golden Cuttlefish *Sepia esculenta* (Cephalopoda: Sepiidae). J.Ocean Univ. China 3(1): 48-52.



Subject: Genetic variation survey of Intra-specific (*Sepia pharaonis*) in the Persian Gulf and the Oman Sea using PCR-RFLP

By: Reza Nahavandi

Summary:

This research was conducted to identify Cuttlefish population (*Sepia pharaonis*) in The Persian Gulf and the Oman Sea using PCR-RFLP. Specimens were collected from 10 different stations. Bottom trawling method was used for sampling from different zones of the Persian Gulf and the Oman Sea, and finally 2-3 specimens from *S. Pharaonis* were collected at each station. DNA was extracted by phenol-chloroform method. One pair primer was designed based on 18S rRNA gene nucleotide sequences. The results obtained from 18S rRNA gene RFLP, which was reproduced by PCR technique, were analyzed and utilized for study of diversity of the Cuttlefish population. PCR product with 0.2 pair base in length achieved for all specimens, which was subjected to enzymatic digestion by 8 restriction action enzymes:

Alu I-Taq I-Mnl I- Rsa I-Hind III-Dra I-Pvu II and Hae II

DNA bands patterns in all specimens digested by those enzymes showed similarity with no any polymorphism. From this result, it can be concluded that there is not any possibility to isolate different populations in the studied Cuttlefish species under exploitation of rRNA gene.

Key words: RFLP-PCR- Cuttlefish -Persian Gulf and the Oman Sea -Ribosomal RNA gene.